

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

(21) **PI0904083-8 A2**



(22) Data de Depósito: 20/10/2009
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)

(51) Int.Cl.:

A61K 9/51 2006.01
A61K 31/722 2006.01
A61K 31/573 2006.01
A61K 38/12 2006.01
A61P 27/14 2006.01
A61P 31/04 2006.01

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS POSITIVAMENTE CARREGADAS, VESÍCULAS ANFIFÍLICAS POSITIVAMENTE CARREGADAS, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS E SEUS USOS

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Universidade de São Paulo - USP, Universidade de São Paulo - USP, Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): NÁDIA ARACI BOU CHACRA, SILVIA STANISÇUASKI GUTERRES, TELMA MARY KANEKO, TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS POSITIVAMENTE CARREGADAS, VESÍCULAS ANFIFÍLICAS POSITIVAMENTE CARREGADAS, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS E SEUS USOS. A presente invenção provê um método de obtenção de vesículas anfifílicas e vesículas anfifílicas com dupla camada poliméricas, positivamente carregadas contendo pelo menos dois ativos, com distintas solubilidades (hidrossolúveis e lipossolúveis). Adicionalmente, o presente pedido destina-se a composições farmacêuticas e/ou cosméticas contendo as ditas vesículas anfifílicas e suas aplicações como agente antineoplásicos, antimicrobiano e antiinflamatório.



**“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS
POSITIVAMENTE CARREGADAS, VESÍCULAS ANFIFÍLICAS
POSITIVAMENTE CARREGADAS, SUAS COMPOSIÇÕES
FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS E SEUS USOS”**

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê um método de obtenção de vesículas anfifílicas e vesículas anfifílicas com dupla camada poliméricas, positivamente carregadas contendo pelo menos dois ativos, com distintas solubilidades (hidrossolúveis e lipossolúveis). Adicionalmente, o presente
10 pedido destina-se a composições farmacêuticas e/ou cosméticas contendo as ditas vesículas anfifílicas e suas aplicações como agente antineoplásicos, antimicrobiano e antiinflamatório.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências
15 farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug
20 releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. *Radiat. Phys. Chem.*, Amsterdam, v.76, p.733-737, 2007).

A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos foi recentemente
25 denominada "Nanomedicina" pelo *National Institute of Health* nos Estados Unidos (MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB J.*, v.19, p.311-330, 2005). Esta tecnologia surgiu nos anos 1960 com o desenvolvimento inicialmente da microencapsulação, técnica de transformação de líquidos

(polímeros e outras substâncias) em pós com tamanho de partículas micrométricas. A microencapsulação é bastante utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias lábeis e voláteis, o controle da liberação do fármaco, contribuindo para a melhoria na biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade. A microencapsulação serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas.

A descoberta dos lipossomas na década de 1960 veio aumentar a variedade de ferramentas para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica com sistemas lipídicos para vetorização de fármacos (LASIC, D.D. Novel application of liposomes. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, v.16, p.307-321, 1998). Atualmente são desenvolvidos nanossistemas, tais como lipossomas e nanopartículas, e microssistemas, como micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões (SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurol.*, Amsterdam, v.61, p.216-220, 2004).

Lipossomas são vesículas aquosas circundadas por bicamada lipídica podendo servir como veículo de fármacos a serem encapsulados na cavidade aquosa da vesícula ou na bicamada lipídica (LASIC, D.D. Novel application of liposomes. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, v.16, p.307-321, 1998). Nanopartículas são partículas poliméricas na forma de reservatório (cápsulas) ou matricial (matriz polimérica) nas quais o fármaco está encapsulado ou adsorvido na malha polimérica (BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Del. Rev.*, Arlington, v.54, p.631-651, 2002).

Nos anos 1990 surgiram nanossistemas mais sofisticados revestidos por polímeros hidrofílicos, denominados sistemas furtivos, que permitem um tempo de circulação maior no organismo (GREF, R.;

MINAMITAKE, Y.; PERACCHIA, M.T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, New York, v.263, p.1600-1603, 1994). Além dos sistemas furtivos, sistemas contendo moléculas sinalizadoras na superfície denominada

5 sítio-específicos foram desenvolvidos com a finalidade do direcionamento específico de fármacos para células alvo (BARRAT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharma. Sci. Technol. Today*, Cambridge, v.5, p.163-171, 2000).

Entre as vantagens que os nanossistemas podem oferecer

10 destacam-se: a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante; o aumento da eficácia terapêutica; a liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a

15 variação de pH ou de temperatura); a diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima; a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis; a possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítio-especificidade); a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos

20 dispositivos; a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente. Embora estas vantagens sejam significativas, alguns inconvenientes plausíveis não podem ser ignorados, como por exemplo, uma possível toxicidade, ausência de biocompatibilidade dos materiais utilizados e o elevado custo

25 de obtenção dos nanossistemas comparados com as formulações farmacêuticas convencionais (VERMA, R.K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. *Pharmac. Technol.*, v.25, n.2, p.1-4, 2001; DUNNE, M.; BIBBY, D.C.; JONES, J.C.; CUDMORE, S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and

polylactide-co-glycolide microparticles. *J. Control. Release*, Amsterdam, v.92, p.209-219, 2003; TAO, S.L.; DESAI, T.A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Adv. Drug Del. Rev.*, Arlington, v.55, p.315-328, 2003).

5 Lipossomas, vesículas aquosas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios são uma excelente forma de sistema de liberação controlada de fármacos devido à sua flexibilidade estrutural (tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica), como à sua capacidade de incorporar variedade de compostos hidrofílicos (ANDRADE, 10 C.A.; CORREIA, S.M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.278, p.435-445, 2004) e hidrofóbicos (PONTES, A.C.O.; CAETANO, M.N.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Physicochemical characterization and antimicrobial 15 activity of benzathine penicillin G liposomes. *S.T.P. Pharma Sci.*, Paris, v.9, p.419-427, 1999), sendo os sistemas nanométricos mais estabelecidos clinicamente para a entrega de fármacos citotóxicos, genes e vacinas (DIEBOLD, Y.; JARRÍN, M.; SÁEZ, V.; CARVALHO, E.L.S.; OREA, M.; CALONGE, M.; SEIJO, B.; ALONSO, M.J. Ocular drug delivery by 20 liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials*, Amsterdam, v.28, n.8, p.1553-1564, 2006). Os lipossomas podem ter tamanhos variados (20 nm até alguns micrometros) com espessura de bicamada lipídica em torno de 6 nm. Os lipossomas como sistemas de liberação controlada de fármacos não apenas possibilitam a vetorização e 25 a proteção do fármaco, como também permitem o possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos (sítio-específicos) (BERGSTRAND, N.; ARFVIDSSON, M.C.; KIM, J.M.; THOMPSON, D.H.; EDWARDS, K. Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes. *Biophys. Chem.*, Amsterdam, v.104, p.361-379, 2003;

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligant-target liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.*, Amsterdam, v.42, p.439-462, 2003).

As infecções e as inflamações que acometem a região ocular causam extremo desconforto e ansiedade aos pacientes. O tratamento via
5 sistêmico, de forma geral, não permite que concentração terapêutica do ativo alcance a região ocular. Assim sendo, a administração tópica constitui tratamento de escolha, porém sua eficácia pode ser comprometida. As preparações convencionais, após aplicação, são rapidamente removidas do globo ocular em função dos mecanismos de
10 proteção do olho. Além disso, a córnea atua como barreira contribuindo para a reduzida concentração do fármaco, nesse órgão. Dessa forma, o fármaco veiculado, por tais preparações apresenta reduzida biodisponibilidade. Essa indesejável característica conduziu pesquisadores à busca de preparações inovadoras, com maior eficácia terapêutica.

15 Quanto às recentes estratégias, as utilizações de sistema coloidal nanoparticulado, assim como o uso de polímeros com propriedade bioadesiva têm sido avaliadas. Essas estratégias visam o controle de liberação do fármaco e o aumento do seu tempo de residência na região ocular (AMRITE, A.C.; KOMPELLA, U.B. Size-dependent disposition of
20 nanoparticles and microparticles following subconjunctival administration. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 57, n. 12, p. 1555-1563, 2005; BEJANIA, R. A.; BEHAR-COHENA, F.; BENEZRA, D.; GURNY, R.; DELIE, F. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the posterior segment of the eye. *Chimia*, v. 59, n.6, p. 344-347, 2005; BUCOLO, C.; MALTESE, A.;
25 PUGLISI, G.; PIGNATELLO, R. Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by an eudragit RS 100 nanoparticle suspension. *Ophthalmic Research*, v. 34, n.5, p. 319-323, 2002; BUCOLO, C.; MALTESE, A.; MAUGERI, F.; BUSÀ, B.; PUGLISI, G.; PIGNATELLO, R. Eudragit RL 100 nanoparticle system for the ophthalmic delivery of

cloricromene. *J. Pharmacy Pharmacology*, v. 56, n. 7, p. 841-846, 2004; BUCOLO, C.; MALTESE, A.; PUGLISI, G.; PIGNATELLO, R. Enhanced ocular anti-inflammatory activity of ibuprofen carried by na Eudragit RS 100® nanoparticle suspension. *Ophthalmic Research*, v. 34, n. 5, p.319-5 323, 2002; CAVALLI, R.; GASCO, M.R.; CHETONI, P.; BURGALASSI, S.; SETTONE, M.F. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.*, v. 238, v.1-2, p. 241-245, 2002).

Entre os diferentes polímeros empregados na preparação de sistemas coloidais nanoparticulados, a quitosana tem demonstrado 10 adequadas características para seu uso em preparações oftálmicas. Tal substância é biodegradável, biocompatível e apresenta bioadesividade. Essa última importante característica é decorrente de sua propriedade catiônica, que permite sua interação eletrostática com as cargas negativas da camada mucosa do globo ocular. Além disso, a quitosana apresenta 15 atividade antimicrobiana, propriedade cicatrizante, e ainda, apresenta viscoelasticidade (DE CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M.J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporine A. *Int. J. Pharm.*, v. 224, n. 1-2, p. 150-168, 2001; DE CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, 20 A.; GRET, R.; CALVO, P.; ALONSO, M.J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *European J. Pharm. Sci.*, v. 20, p. 73-81, 2003; DE CAMPOS, A. M.; DIEBOLD, Y., CARVALHO, E.L.S., SANCHEZ, A., ALONSO, M.J. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery 25 systems: in vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity. *Pharm. Res.* v. 21, n.5, p. 803-810, 2004; DE SALAMANCA, A.E., DIEBOLD, Y., CALONGE, M., GARCIA-VAZQUEZ, C. CALLEJO, S., VILA, A., ALONSO, M.J. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: Toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance.

Investigative Ophthalmology & Visual Sci., v. 47, n.4, p.1416-1425, 2006).

Em geral, o uso tópico de preparações oftálmicas contendo associação de antiinflamatório esteroidal e antibiótico está indicado nas infecções superficiais como conjuntivites, ceratoconjuntivites e blefarites bacterianas tendo em vista que tais ativos não penetram nas estruturas mais internas do olho.

No caso de infecções intra-oculares (endoftalmites), essas devem ser tratadas com associação de antimicrobianos e, ministrados, na forma de injeção do medicamento, no humor vítreo. Tal procedimento deve ser realizado por especialista, sendo também indicada a vitrectomia parcial (remoção do humor vítreo) na dependência da gravidade da infecção (LAVINSKY, J.; FIOR, O.; GOLDHARDT, R.; DEI RICARDI, L.M. Complications of lens displacement into the vitreous cavity. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v. 65, n. 4, 2002; SERRACARBASSA, P.D.; SERRACARBASSA, L.L.; RODRIGUES, L.D. Intravitreal antibiotics. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v. 66, n. 4, 2003).

Dessa forma, o desenvolvimento de produto tópico ocular que permita adequada biodisponibilidade dos fármacos, nas estruturas externa e interna do olho, constitui tendência terapêutica no que se refere ao tratamento de infecções oculares.

As preparações oftálmicas convencionais, após aplicação, são rapidamente removidas do globo ocular em função dos mecanismos de proteção do olho. Além disso, a córnea atua como barreira contribuindo para a reduzida concentração do fármaco, nesse órgão. Dessa forma, os ativos veiculados por tais preparações apresentam reduzida biodisponibilidade. Essa indesejável característica conduziu pesquisadores à busca de preparações inovadoras, com maior eficácia terapêutica.

O pedido de patente PI 8802279 refere-se ao processo de preparação de partículas de polímeros com moléculas anfífilas

implantadas na sua superfície portando grupos ionógenos ou reativos a partículas ou dispersões aquosas de partículas.

A patente européia EP 860.166 trata de nanopartículas (com uma dimensão nanométrica e um caráter hidrofílico), também chamado
5 nanoesferas ou látex. Tais sistemas coloidais são compostos por uma combinação de polímeros hidrofílicos e um ingrediente ativo com um elevado peso molecular (macromolécula ativa, massa molecular mais elevada do que 1.000 daltons).

A patente americana US 6.916.488 pleiteia copolímeros que
10 são macromoléculas compostas por dois ou mais tipos distintos de unidade de repetição (monômero). Os copolímeros (dibloco e tribloco) apresentam características hidrofóbicas e hidrofílicas.

A patente americana US 6.616.946 trata de partículas poliméricas para a disponibilização de ativos em diferentes estados de
15 permeabilidade através de copolímeros anfílicos em triblocos (ABA ou BAB), sendo (A) a porção hidrofílica e (B) a porção hidrofóbica.

Mediante todo o exposto, a Depositante, de forma inesperada desenvolveu um processo de obtenção de vesículas anfílicas, com dupla
camada polimérica, positivamente carregada para administração
20 simultânea de diversos agentes ativos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 mostra a visualização gráfica dos (a) valores de diâmetro (nm) e (b) dos valores de potencial zeta (mV), sendo os valores relativos aos dados apresentados na Tabela 4.

25 A figura 2 representa a microscopia eletrônica de transmissão relativa às nanocápsulas contendo acetato de dexametasona (0,1% p/v), sendo (a) 50K e (b) 120K.

A figura 3 descreve a probabilidade normal, valores ajustados, histograma e valores residuais do potencial zeta relativo ao ensaio para a

otimização da dispersão da quitosana utilizada no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona.

A figura 4 propõe a probabilidade normal, valores ajustados, histograma e valores residuais do diâmetro relativo ao ensaio para a
5 otimização da dispersão da quitosana utilizada no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona.

A figura 5 revela o gráfico de contorno relativo ao diâmetro no ensaio para a otimização de dispersão de quitosana no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, sendo os valores
10 válidos de polimixina de 1,5 e A <300; B de 300 a 325; C de 325 a 350; D de 350 a 375; E de 375 a 400; F de 400 a 425; G de 425 a 450 e H > 450.

A figura 6 mostra o gráfico de contorno relativo ao potencial zeta no ensaio para a otimização de dispersão de quitosana no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, sendo
15 o valor fixo de polimixina de 1,5 e A <3; B de 3 a 6; C de 6 a 9; D de 9 a 12; E de 12 a 15 e F > 15.

A figura 7 representa a superfície de resposta relativa ao diâmetro no ensaio para a otimização de dispersão de quitosana no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, com
20 valores válidos de sulfato de polimixina de 1,5.

A figura 8 ilustra a superfície de resposta relativa ao potencial zeta no ensaio para a otimização de dispersão de quitosana no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, com
valor fixo de sulfato de polimixina de 1,5.

25 A figura 9 descreve os valores otimizados da dispersão de quitosana e concentração final dessa dispersão na suspensão de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona para as respostas diâmetro e potencial zeta.

A figura 10 exhibe a visualização gráfica dos valores de

diâmetro (nm) relativos aos dados apresentados na Tabela 11.

A figura 11 apresenta a visualização gráfica dos valores de potencial zeta (mV) (b) relativos aos dados apresentados na Tabela 11.

A figura 12 mostra a microscopia eletrônica das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona revestidas quitosana, sendo (a) 50K e (b) 120K.

A figura 13 apresenta a microscopia eletrônica das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona revestidas com quitosana, e com sulfato de polimixina B, sendo (a) 50K e (b) 120K.

A figura 14 descreve a curva padrão relativa ao ensaio empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação da taxa de associação do acetato de dexametasona à nanocápsula, sendo $y = 35073x + 5133,6$ e $R^2 = 0,9991$.

A figura 15 apresenta a ilustração representativa da possível nanoestrutura obtida contendo acetato de dexametasona e sulfato de polimixina B.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê um método de obtenção de vesículas anfífilas e vesículas anfífilas com dupla camada poliméricas, positivamente carregadas contendo pelo menos dois ativos, com distintas solubilidades (hidrossolúveis e lipossolúveis). Adicionalmente, o presente pedido destina-se a composições farmacêuticas e/ou cosméticas contendo as ditas vesículas anfífilas e suas aplicações como agente antineoplásicos, antimicrobiano e antiinflamatório.

Em uma primeira realização o presente pedido destina-se ao método de obtenção de vesículas anfífilas através da precipitação do polímero pré-formado que consiste nas etapas de (a) adição da fase orgânica contendo polímeros de caprolactonas e polissacarídeos catiônicos sobre a fase aquosa contendo pelo menos um agente tensoativo hidrofílico

etoxilado, preferencialmente, sob agitação de cerca de 250 rpm, temperatura entre 37 e 40°C por 60 minutos, seguidos pela eliminação do solvente e parte da água, (b) revestimento da vesícula nanométrica com biopolímero, com concentrações da dispersão coloidal de quitosana de cerca de 1,87% (p/v) e da concentração final de cerca de 0,497% (v/v), sob agitação de 50 rpm por cerca de 60 minutos, na suspensão contendo as nanocápsulas, (c) incorporação de polipeptídeos, preferencialmente, sulfato de polimixina B.

A fase orgânica da presente invenção pode conter lactonas, tais como, polímeros de caprolactona, preferencialmente, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), ácido lático e glicólico, tais como, polímeros dos ácidos lático e glicólico, preferencialmente, poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e poli(ácido lático) (PLLA), acetona e outros solventes orgânicos tais como álcoois isolados e/ou em combinação com acetona, preferencialmente, acetona, ácidos cáprico e caprílico, tais como, triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, preferencialmente, mistura dos triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, ácidos oléico, mirístico, linoléico, linolênico, esteárico, palmítico, eicosanóico, eicosenóico, láurico, butírico. Ainda podem ser utilizados, na fase orgânica, óleos vegetais, tais como, óleos de castanha do Brasil, açaí, buriti, pequi, tucumã, urucum, maracujá, coco de babaçu, oliva, girassol, soja, arroz, gergelim, palma, amêndoas doces, manteigas de cacau, manteiga de cupuaçú, manteiga de murumuru e manteiga de ucuúba. Além dos componentes descritos a fase orgânica pode conter agentes tensoativos lipofílicos, tais como, monoestearato e monooleato de sorbital, álcool estearílico etoxilado com 2 e 20 mols de óxido de eteno, álcool cetoestearílico com 20 mols de óxido de eteno, mistura de éster graxo e ácido graxo etoxilado e mistura de álcool graxo etoxilado, fosfolipídeos e/ou lecitina soja.

Entre os diferentes polímeros empregados na preparação de

sistemas coloidais nanoparticulados, a quitosana (biopolímero) demonstra características adequadas, pois é uma substância biodegradável, biocompatível e apresenta bioadesividade. A bioadesividade é decorrente de sua propriedade catiônica, que permite sua interação eletrostática com as cargas negativas da camada a ser aplicada. Opcionalmente, também podem ser utilizados, no revestimento, alginato, ácido hialurônico, polissacárideos de origem microbiana ou não e/ou quitina.

A fase aquosa do presente pedido de patente pode conter agentes tensoativos hidrofílicos etoxilados, tais como, monolaurato de sorbitano etoxilado, monoestearato de sorbitano etoxilado e monooleato de sorbitano etoxilado, preferencialmente, monoestearato de sorbitano etoxilado.

Os ingredientes ativos da fase orgânica podem ser escolhidos entre dexametasona (como agente antiinflamatório), antiglaucomas, antihipertensivos, antimaláricos e demais antiprotozoários, imunossupressores, vitaminas, antivirais, analgésico-antipiréticos, hormônios e antagonistas de hormônios, hipnóticos e sedativos, antidepressivos, ansiolíticos, anestésicos locais e gerais, antiarrítmicos, diuréticos, antieméticos, agentes anticolinesterásicos, simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos, agonistas e antagonistas dos receptores da serotonina, cardiotônicos, antiúlcera e anti-secretora ácida, anti-hipercolesterolêmicos, antidiarréicos, além de DNA, gene e peptídeos.

Já na fase de revestimento, os ativos podem ser escolhidos entre vacinas, antivirais e antiparasitários derivados de interferon, antidiabéticos, antimicrobianos, como derivados de prata, agentes antitumorais, por exemplo, derivados de platina e aminoácidos, agentes antireumáticos, tais como, derivados de ouro e/ou outros metais nobres, antineoplásicos incluindo os de base de aminoácidos, antagonistas de bradicinina, antimicrobianos e/ou antiinflamatórios à base de peptídeos

de origem sintética e/ou natural.

O solvente constituído de acetona, etanol e/ou mistura entre acetona e etanol e parte da água (entre 20 e 150 mL) são eliminados com um evaporador rotatório e o volume da suspensão ajustado em balão
5 volumétrico. Após a preparação, o diâmetro e a polidispersão das nanocápsulas obtidas foram determinados assim como o potencial zeta. Adicionalmente, realiza-se uma análise morfológica das nanopartículas empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET).

O potencial zeta das nanoestruturas é e +22,80 mV e o
10 diâmetro de aproximadamente 390 nm.

De forma particular, a presente invenção trata da associação do sulfato de polimixina B (polipeptídeo), na camada duplo-polimérica (quitosana+poli- ϵ -caprolactona), utilizando complexo pré-formado de quitosana-polimixina B. Esse complexo foi adicionado, sob agitação, às
15 nanocápsulas contendo acetato de dexametasona. A velocidade para a realização do processo de obtenção da dita vesícula varia de 30 a 250 rpm, preferencialmente, 50 rpm e o tempo de agitação de cerca de 10 a 120 minutos, preferencialmente, 60 minutos para a efetiva associação do polipeptídeo à nanoestrutura.

20 Os peptídeos utilizados na presente invenção são escolhidos entre peptídeos de origem natural e/ou sintética, tais como T-2022, um peptídeo sintético composto de 36 aminoácidos, gomesina, agente tensoativo pulmonar natural exógeno de origem suína, decapeptídeos com atividade antimicrobiana, peptídeos altamente ativos biologicamente e
25 farmacologicamente, como, por exemplo, para o tratamento da doença relacionada à sarcoidose; peptídeo beta-amilóide, filosseptina-1 (PS-1), antimicrobiano pertencente à família de peptídeos catiônicos denominados filosseptinas, encontrado na secreção cutânea da perereca *Phyllomedusa hypochondrialis* entre outros peptídeos com atividade biológica e

farmacológica derivados de fontes biológicas ou sintéticos. As quantidades desses peptídeos podem variar de 3.000UI/mL à 6.000UI/mL.

Em uma segunda realização o presente pedido refere-se especificamente às vesículas anfífilas, positivamente carregadas, obtidas
5 pelo processo anteriormente descrito, apresentando diâmetro de 100nm a 750nm, em particular, entre 300nm e 600nm, preferencialmente entre 450nm e 550nm. Dessa forma, tais vesículas são denominadas como nanovesículas anfífilas positivamente carregadas.

Ainda a nanovesícula da presente invenção apresenta uma
10 taxa de associação e/ou eficiência de encapsulamento do acetato de dexametasona que varia de 90% (p/v) a 100% (p/v) em seu núcleo oleoso, que é compreendido por triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico.

O revestimento das nanocápsulas com quitosana contendo acetato de dexametasona apresenta concentrações de 1,0 a 3,0% p/v,
15 particularmente, 1,87% (p/v) para a concentração da dispersão coloidal de quitosana e 0,2 a 0,5% v/v, particularmente, 0,497% (v/v) para a concentração final da mesma, na suspensão contendo as nanocápsulas.

A nanoestrutura do presente pedido ainda oferece uma característica especial, de camada duplo-polimérica, carreadora
20 simultânea de ativos com características hidrofílicas (polipeptídeos) e hidrofóbicas (corticóides) sendo a mesma positivamente carregada.

A taxa de associação do sulfato de polimixina B alcançou índice superior a 50%.

As nanoestruturas revestidas com quitosana contendo acetato
25 de dexametasona e sulfato de polimixina B apresentaram potencial zeta positivo de aproximadamente +10,00 à +25,00 mV, particularmente, +17,00 mV.

Ainda a nanoestrutura da presente invenção se apresenta com pH próximo à neutralidade entre 5,5 a 7,5, preferencialmente 6,8.

Como formulação opcional a nanoestrutura apresenta uma propriedade de tempo de residência em sua aplicação na qual gera a possibilidade de liberação controlada, prolongada e/ou modificada dos ingredientes ativos usados na nanovesícula.

5 Em uma terceira realização a presente invenção pleiteia composições farmacêuticas e/ou cosméticas contendo as ditas nanoestruturas. Tais composições podem ser pós, cápsulas, comprimidos, comprimidos revestidos e drágeas; pó compactado (sombra para olhos; pó facial) e não compactado (talco, amido, polvilho e sais de banho) pomadas, 10 cremes, supositórios e óvulos, batom, desodorante e antitranspirante, protetor solar e sombra para olhos, emulsões e suspensões, máscara, protetor solar, produtos para barba e pós-barba, esmalte, antissépticos, errinos, otológicos, gotas orais e xaropes, xampú, tônico capilar, tônico facial, removedor de maquiagem, removedor de esmaltes, colírios, 15 injetáveis de pequeno e grande volume, preferencialmente em suspensões e pomadas oftálmicas, porém não se limitando a estes.

As nanoestruturas, de forma particular, foram empregadas em suspensões oftálmicas para o tratamento de infecções oculares causadas por bactérias gram-negativas acompanhadas por reação inflamatória.

20 Por fim, o presente pedido indica o uso das ditas nanoestruturas como agentes antineoplásicos, antimicrobiano e antiinflamatório em composições farmacêuticas e/ou cosméticas.

EXEMPLOS

PREPARAÇÕES DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO ACETATO DE DEXAMETASONA E

25 SULFATO DE POLIMIXINA B REVESTIDAS COM QUITOSANA

O processo de obtenção das nanovesículas anfífilas, positivamente carregadas, se dá através das etapas de (a) precipitação de polímero pré-formado, (b) preparação da dispersão de revestimento das nanovesículas contendo biopolímero e o ativo hidrofílico e (c) revestimento

das nanovesículas.

Na etapa (a) realizou-se adição da fase orgânica na fase aquosa foi efetuada após completa dissolução do polímero (1 hora sob agitação a 250 rpm e temperatura entre 37 a 40°C). A etapa (b) de
5 preparação da dispersão de revestimento das nanovesículas contendo biopolímero (quitosana) e o ativo hidrofílico (sulfato de polimixina B) foi preparada empregando quitosana com baixo peso molecular e grau de acetilação mínimo de 85%. Quantidade igual a 1,87 g do biopolímero foi dispersa em 100 mL de água purificada, sob agitação, empregando
10 agitador magnético (200 rpm), por 15 minutos. O pH foi ajustado para valor aproximadamente igual a 5,0 empregando ácido clorídrico 0,1 N.

Em 25 mL da dispersão obtida (1,87% p/v) foi adicionada alíquota de 0,1 mL de solução aquosa contendo 600.000 UI de sulfato de polimixina resultando em concentração final de 24.000 UI/mL de sulfato
15 de polimixina na dispersão. O sistema (quitosana + polimixina B) foi submetido à agitação magnética com velocidade de 50 rpm, por período de 60 minutos.

Quanto ao revestimento das nanovesículas, utilizando a dispersão previamente obtida, uma alíquota de 2,5 mL do complexo
20 formado na etapa anterior (quitosana + polimixina B) foi transferida para 7,5 mL de suspensão de nanocápsulas. A mistura foi submetida à agitação por 1 hora a 50 rpm. A concentração final de quitosana e de sulfato de polimixina B na suspensão de nanocápsulas foi de, respectivamente, 0,5% (v/v) (2,5 mL da dispersão a 2% p/v contém 0,05 g
25 de quitosana) e 6.000 UI/mL (2,5 mL do complexo quitosana+polimixina B contém 60.000 UI/mL). Dessa forma, o volume final do produto obtido (10 mL) contém 0,5% (v/v) de quitosana e 6.000 UI/mL de sulfato de polimixina B.

Em geral, para a obtenção das nanocápsulas contendo

dexametasona foi utilizado o método de precipitação de polímero pré-formado que consiste na adição, sob agitação, da fase orgânica contendo o ácido poli (ϵ -caprolactona) (PCL), a acetona, a dexametasona e a mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, sobre fase aquosa contendo polissorbato 80 (Tabela 1).

A eliminação do solvente e parte da água foi efetuada empregando evaporador rotatório e o volume da suspensão foi ajustado em balão volumétrico. Após a preparação, o diâmetro e a polidispersão das nanocápsulas obtidas foram determinados assim como o potencial zeta. Adicionalmente foi realizada a análise morfológica das nanopartículas empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET).

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO

ACETATO DE DEXAMETASONA

A caracterização física das suspensões foi efetuada conforme descrito por SCHAFFAZICK e seus colaboradores (SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Ver. Quim. Nova*, v.26, n.5, 2003).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A análise morfológica (superfície e forma) das micropartículas foi realizada empregando microscopia eletrônica de varredura. As nanopartículas foram previamente metalizadas com ouro.

DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

O diâmetro das partículas em suspensão foi determinado por espalhamento de luz dinâmica diluindo-se as amostras e observando-se a luz espalhada em ângulo de 90°C. Os resultados corresponderam à média de 3 (três) determinações. O tamanho das partículas foi determinado empregando equipamento Zetasizer 3000. As amostras foram medidas em suspensão, após a preparação.

POTENCIAL ZETA

O potencial zeta foi medido empregando equipamento Zetasizer 3000. As amostras foram diluídas em água destilada estéril antes da medição visando à otimização da intensidade do sinal. Para cada amostra foram efetuadas 10 (dez) medições, e a média resultante foi utilizada nos cálculos adicionais.

A tabela 1 abaixo mostra a fórmula das nanocápsulas obtidas pelo método de precipitação contendo acetato de dexametasona para volume final de 10, 50 e 100 mL.

10

TABELA 1

FASE ORGÂNICA			
Componentes	Volume (mL)		
	10	50	100
	Peso (g)		
Poli(ϵ -caprolactona)	0,1000	0,5000	1,0000
Monoestearato de sorbitan (span 60)	0,0770	0,3850	0,7770
Triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico (Myglyol [®])	0,3333	1,6665	3,3333
Acetato de dexametasona	0,0100	0,0500	0,1000
Acetona P.A. (mL)	27,0	135,0	270,0
FASE AQUOSA			
Componentes	Volume (mL)		
	10	50	100
	Peso (g)		
Polissorbato 80	0,0770	0,3850	0,7770
Água purificada (mL)	53,0	265,0	530,0

**OTIMIZAÇÃO DA DISPERSÃO DE QUITOSANA PARA O REVESTIMENTO DAS
NANOCÁPSULAS CONTENDO ACETATO DE DEXAMETASONA**

Para o revestimento foi empregada quitosana com baixo peso molecular e grau de acetilação mínimo de 85%. Quantidade igual a 2,0, 3,0 e 4,0 g do biopolímero foi dispersa em 100 mL de água purificada,

15

sob agitação, empregando agitador magnético (200 rpm), por 15 minutos. O pH foi ajustado para valor aproximadamente igual a 5,0 empregando ácido clorídrico 0,1 N.

O planejamento fatorial utilizado para a otimização foi constituído de variáveis contínuas e categóricas, com diferentes níveis. Foram utilizados três e quatro níveis respectivamente para a concentração da dispersão de quitosana (2,0; 3,0 e 4,0% p/v) e para a concentração final da quitosana na fórmula (0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% v/v). Para a variável categórica foram incluídos apenas dois níveis: presença ou ausência de sulfato de polimixina B a 6.000 UI/mL, conforme apresentado na Tabela 2. A análise estatística foi efetuada empregando software Minitab® versão 15.

Além disso, foram efetuados ensaios preliminares tendo em vista a obtenção das melhores condições para o revestimento. Dessa forma, a adição de quitosana (concentrações indicadas na Tabela 2) na suspensão de nanocápsulas foi efetuada da seguinte forma: de cada dispersão obtida (2,0, 3,0 e 4,0% p/v) foi transferida alíquota visando concentração final na suspensão de 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% v/v. Após adição, o sistema foi submetido à agitação magnética por 1 hora com velocidade de agitação de 50 rpm. Para os ensaios prevendo a adição de sulfato de polimixina B, preparou-se solução concentrada do antimicrobiano (600.000 UI/0,1mL). Alíquota de 0,1 mL dessa solução foi transferida para 100 mL de dispersão de quitosana (2,0 3,0 e 4,0% p/v). O sistema permaneceu sob agitação magnética com velocidade de 50 rpm, por período de 60 minutos. Após esse período foi transferida alíquota visando concentração final na suspensão de 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% v/v. Após adição,

o sistema foi submetido à agitação magnética por 1 hora com velocidade de agitação de 50 rpm.

A tabela 2 refere-se a matriz de ensaio para a otimização da dispersão de quitosana no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona. Onde PDI: polidispersão; N: número do ensaio e Sulfato de Polimixina: (1) ausente e (2): presente a 6.000 UI/mL

TABELA 2

Nº	Dispersão Quitosana (%p/v)	%(v/v) Quitosana Fórmula	Sulfato de Polimixina
1	3,0	0,4	1
2	2,0	0,4	1
3	3,0	0,5	1
4	1,0	0,3	1
5	1,0	0,2	1
6	1,0	0,4	2
7	3,0	0,4	1
8	1,0	0,4	1
9	1,0	0,5	2
10	2,0	0,2	1
11	3,0	0,3	1
12	2,0	0,3	2
13	2,0	0,3	1
14	2,0	0,5	1
15	1,0	0,2	2
16	1,0	0,5	1
17	3,0	0,5	2
18	3,0	0,4	2

19	3,0	0,2	1
20	1,0	0,3	2
21	2,0	0,4	2
22	2,0	0,2	2
23	3,0	0,2	2
24	2,0	0,5	2

**ASSOCIAÇÃO DO SULFATO DE POLIMIXINA B À CAMADA DE QUITOSANA DA
NANOCÁPSULA CONTENDO ACETATO DE DEXAMETASONA**

Com relação à adição do sulfato de polimixina B visando sua associação à camada de quitosana, foi efetuado o seguinte procedimento:

5 transferiu-se volume adequado de dispersão de quitosana a 2,0% (p/v) de forma a alcançar concentração final na preparação igual a 0,5% (v/v). Nesse volume, foi adicionado sulfato de polimixina B visando concentração final de 6.000UI/mL. Homogeneizou-se a dispersão empregando velocidade de 50 rpm, por 1 hora. Após esse período

10 adicionou-se volume adequado de suspensão de nanocápsulas contendo o acetato de dexametasona e homogeneizou-se por 1 hora com velocidade de agitação de 50 rpm. Após a adição de sulfato de polimixina B na suspensão de nanocápsulas, foi efetuada a determinação do diâmetro, da polidispersão e do potencial zeta da preparação obtida. Adicionalmente foi

15 realizada a análise morfológica das nanopartículas empregando microscopia eletrônica de transmissão (MET).

COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS NANOCÁPSULAS

Foram preparadas três diferentes suspensões: nanocápsulas contendo acetato de dexametasona 0,1% (p/v) (1); nanocápsulas contendo

20 acetato de dexametasona 0,1% (p/v) revestidas com quitosana (2); e nanocápsulas contendo acetato de dexametasona 0,1% p/v e sulfato de polimixina B (6.000 UI/mL) associado à quitosana (3). As suspensões

foram preparadas conforme descrito anteriormente, empregando concentração otimizada para o revestimento com quitosana.

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE ASSOCIAÇÃO DO ACETATO DE DEXAMETASONA

EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

5 A concentração de acetato de dexametasona ligado ao sistema nanoparticulado foi avaliada por meio de centrifugação das partículas em suspensão a 14.000 rpm por 2 horas. Amostra do sobrenadante (teor do fármaco não ligado à partícula) foi analisada empregando método tradicional. Para a dexametasona foi utilizado método por cromatografia
10 líquida de alta eficiência (CLAE).

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE ASSOCIAÇÃO DO SULFATO DE POLIMIXINA B

EMPREGANDO MÉTODO MICROBIOLÓGICO

O ensaio para a determinação da taxa de associação do sulfato de polimixina B foi efetuado conforme compêndio oficial (USP
15 XXVI).

Foram efetuados ensaios comparativos abrangendo amostras preparadas da seguinte forma: (1) nanocápsulas contendo acetato de dexametasona (0,10% p/v) revestida com quitosana. A adição de sulfato de polimixina (6.000 UI/mL), na suspensão de nanocápsulas, foi efetuada
20 imediatamente antes do ensaio empregando agitação manual até a completa dissolução do pó; (2) nanocápsulas contendo acetato de dexametasona (0,10% p/v) revestida com quitosana associada ao sulfato de polimixina B (6.000UI/mL), preparadas conforme descrito anteriormente; (3) sobrenadante da suspensão de nanocápsulas contendo
25 acetato de dexametasona revestidas com quitosana associada ao sulfato de polimixina B (6.000 UI/mL), após centrifugação a 14.000 rpm, por período de 2 horas; (4) nanocápsulas contendo acetato de dexametasona (0,10% p/v) revestida com concentração otimizada de quitosana, sem a

adição de sulfato de polimixina B (controle).

A taxa de associação do sulfato de polimixina B foi calculada pela diferença entre os resultados obtidos da suspensão contendo 100% do antimicrobiano não-associado, e, portanto, livre (1) e da suspensão
5 contendo o antimicrobiano associado (3).

**PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO OFTÁLMICA CONTENDO NANOCÁPSULAS REVESTIDAS
COM QUITOSANA CONTENDO ACETATO DE DEXAMETASONA E SULFATO DE
POLIMIXINA B**

A preparação da suspensão contendo as nanocápsulas foi
10 efetuada de forma asséptica. Os componentes abaixo (Tabela 3),
excetuando-se o conservante e o polímero, foram homogeneizados
empregando agitação magnética (300 rpm) por 20 minutos. Para essa
solução empregou-se 45 mL de água destilada. A solução foi esterilizada
por filtração empregando membrana com tamanho de poro de 0,22 µm e
15 diâmetro de 45 mm. Volume de 45 mL de dispersão de
hidroxipropilmetilcelulose (hypromellose) a 0,50% (p/v) estéril
(esterilização a vapor 121°C por 20 minutos) foi adicionado à solução.
Após adição do conservante, a dispersão foi homogeneizada por 15
minutos empregando agitador magnético (300 rpm). Aliquota de 10 mL
20 contendo as nanocápsulas foi transferida para essa dispersão. A
suspensão obtida foi homogeneizada por 10 minutos empregando agitador
magnético (300 rpm).

A tabela 3 descreve uma formulação básica relativa à
suspensão oftálmica contendo nanocápsulas contendo acetato de
25 dexametasona a 0,1% (p/v) e sulfato de polimixina B 6000 UI/mL
revestidas com quitosana.

TABELA 3
FORMULAÇÃO BÁSICA - SUSPENSÃO OFTÁLMICA

Componentes	Função	Quantidade (g)
Hypromellose	agente suspensor	0,250
Polissorbatato 20	agente tensoativo	0,025
Fosfato de potássio monossódico	agente tamponante	0,823
Fosfato de potássio dissódico	agente tamponante	0,179
Cloreto de sódio	agente isotonzante	q.s.
Cloreto de benzalcônio	conservante	0,01
Água destilada	q.s.p	100 mL

AVALIAÇÃO DA ISOTONICIDADE

A isotonicidade das suspensões foi determinada pelo abaixamento crioscópico, após 7 dias da preparação empregando equipamento DigiMatic Osmometer modelo 3D. Para isso foi utilizado volume de 10 mL de amostra previamente homogeneizada, em duplicata.

DETERMINAÇÃO DO PH DA SUSPENSÃO

Os valores de pH das suspensões foram obtidos empregando potenciômetro Micronal modelo B474, à temperatura de 25°C, imediatamente após o término da preparação e após 7 dias. Para isso será utilizado volume de 10 mL de amostra previamente homogeneizada, em duplicata.

RESULTADOS

A tabela 3 apresenta os resultados relativos à caracterização física das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona imediatamente após a preparação.

A tabela 4 mostra a média do diâmetro, da polidispersão e do potencial zeta das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona.

TABELA 4

N	Diâmetro	Polidispersão	Potencial Zeta
1	247,2	0,124	-7,16
2	250,1	0,089	-8,50
2	245,8	0,153	-7,12

A tabela 5 apresenta os resultados do estudo para a otimização da concentração de quitosana para o revestimento da nanocápsula contendo acetato de dexametasona. Ainda a tabela 5 apresenta os valores de diâmetro, da dispersão do diâmetro e do potencial zeta relativa à matriz de ensaio para a otimização de dispersão de quitosana no revestimento de nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, sendo PDI: polidispersão; N: número do ensaio e Sulfato de polimixina: (1) ausente e (2) presente a 6.000 UI/mL

10

TABELA 5

N	Dispersão Quitosana (% p/v)	% (v/v) Quitosana Fórmula	Sulfato de polimixina	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1	3,0	0,4	1	292,2	0,293	5,17
2	2,0	0,4	1	309,2	0,571	22,70
3	3,0	0,5	1	299,8	0,261	9,83
4	1,0	0,3	1	294,7	0,268	8,93
5	1,0	0,2	1	281,5	0,275	10,86
6	1,0	0,4	2	388,1	0,633	0,48
7	3,0	0,4	1	292,2	0,293	5,17
8	1,0	0,4	1	293,3	0,241	20,52
9	1,0	0,5	2	301,6	0,411	4,50
10	2,0	0,2	1	432,8	0,300	11,58
11	3,0	0,3	1	292,0	0,326	14,27
12	2,0	0,3	2	625,9	0,757	8,10

13	2,0	0,3	1	293,0	0,403	12,44
14	2,0	0,5	1	296,0	0,571	22,70
15	1,0	0,2	2	425,9	0,585	-1,97
16	1,0	0,5	1	284,2	0,302	18,80
17	3,0	0,5	2	421,9	0,522	0,38
18	3,0	0,4	2	377,4	0,572	2,70
19	3,0	0,2	1	298,0	0,365	11,12
20	1,0	0,3	2	380,1	0,480	-1,41
21	2,0	0,4	2	341,4	0,514	13,53
22	2,0	0,2	2	586,1	0,837	7,04
23	3,0	0,2	2	690,3	0,756	7,10
24	2,0	0,5	2	410,1	0,640	13,57

A tabela 6 apresenta teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação de dispersão de quitosana para o diâmetro das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona. Sendo Coef.: coeficientes; SE Coef.: desvio-padrão dos coeficientes; p: nível de significância; T: estatística T (teste T)- Coef./SE Coef.

TABELA 6

Termos	Coef	SECoef	T	P
Constante	380,35	11,37	33,449	0,000
Solução de Quitosana (% p/v)	40,77	13,93	2,927	0,009
% (v/v) Quitosana Fórmula	- 43,99	15,26	- 2,884	0,010
Sulfato de polimixina	89,37	11,37	7,859	0,000
Solução de Quitosana (% p/v)*	37,23	13,93	2,673	0,016
Sulfato de polimixina				

% (v/v) Quitosana	- 46,71	15,26	-3,062	0,007
Fórmula*				
Sulfato de polimixina				
S = 55,7067 PRESS = 90760,8				
R-Sq = 84,10% R-Sq(pred) = 74,16% R-Sq(adj) = 79,68%				

A tabela 7 apresenta a análise de variância (ANOVA) para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação de dispersão de quitosana para o diâmetro das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, sendo DF: grau de liberdade; Seq SS: soma dos quadrados; Adj SS: soma dos quadrados ajustados; F: estatística F (teste F); Adj. MS: média quadrática ajustada; P: nível de significância.

TABELA 7

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	295356	295356	59071,2	19,04	0,000
Linear	3	244089	244089	81363,2	26,22	0,000
Interaction	2	51267	51267	25633,3	8,26	0,003
Residual Error	18	55858	55858	3103,2		
Total	23	351214				

A tabela 8 representa o teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo selecionado no ensaio para avaliação de dispersão de quitosana para o potencial zeta das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, sendo Coef.: coeficientes; SE Coef.: desvio-padrão dos coeficientes; p: nível de significância; T: estatística T (teste T)- Coef./SE Coef.

TABELA 8

Termos	Coef	SE Coef	T	P
Constantes	13,9575	1,1754	11,875	0,000

Solução de Quitosana (%p/v)	0,2575	0,8311	0,310	0,760
% (v/v) Quitosana Fórmula	2,2225	0,9104	2,441	0,026
Sulfato de polimixina	4,5367	0,6786	6,685	0,000
Solução de Quitosana (%p/v)*	6,6262	1,4395	4,603	0,000
Solução de Quitosana (%p/v)				
Solução de Quitosana (%p/v)*	3,4935	1,1151	3,133	0,006
%(v/v) Quitosana Fórmula				
Solução de Quitosana (%p/v)*	2,082	0,8311	2,506	0,023
Sulfato de polimixina				
S = 3,32446		PRESS = 354,239		
R-Sq = 83,81%		R-Sq(pred) = 69,48%		R-Sq(adj) = 78,10%

A tabela 9 mostra a análise de variância (ANOVA) para testar a significância da regressão para os dados obtidos no ensaio para avaliação de dispersão de quitosana para o potencial zeta das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, sendo DF: grau de liberdade; Seq SS: soma dos quadrados; Adj SS: soma dos quadrados ajustados; F: estatística F (teste F); Adj. MS: média quadrática ajustada; P: nível de significância.

TABELA 9

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	972,92	972,919	162,153	14,67	0,000
Linear	3	560,87	560,873	186,958	16,92	0,000
Square	1	560,87	560,873	186,958	16,92	0,000
Interaction	2	177,87	177,874	88,937	8,05	0,003
Residual Error	17	187,88	187,885	11,052		
Total	23	1160,80				

A tabela 10 demonstra as médias do diâmetro (nm), da polidispersão e do potencial zeta (mV) das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona (0,10% p/v) (1), nanocápsulas contendo acetato de

dexametasona (0,10% p/v) revestidas com quitosana (2) e nanocápsulas contendo acetato de dexametasona e polimixina B, revestidas com quitosana (3), sendo *média entre 3 medições e **média entre 6 medições.

TABELA 10

N	Diâmetro (nm)	PDI	Zeta (mV)
1*	290,7	0,159	-4,782
2*	386,5	0,277	22,80
3**	511,6	0,300	17,16

5 A tabela 11 apresenta as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ de acetato de dexametasona e respectivas áreas relativas à curva padrão do ensaio empregando CLAE para a determinação da taxa de associação à nanocápsula, sendo A: área.

TABELA 11

Concentração $\mu\text{g/mL}$	A1	A2	Média
2,5	93877,50	105193,33	99535,42
5,0	182092,23	170689,85	176391,04
7,5	265771,52	266223,42	265997,47
10	349566,99	350092,34	349829,67
12,5	444856,90	445225,69	445041,30
15	534860,87	535868,9	535364,89
17,5	93877,50	105193,33	99535,42
Ensaio	A	$\mu\text{g/mL}$	%
Teor	313812,79	0,8946	
Livre	2311564,13	0,0658	
Taxa			92,64

10 A tabela 12 mostra a eficiência da associação do sulfato de polimixina B na camada duplo-polimérica das nanocápsulas contendo acetato de dexametasona, (1) Suspensão contendo sulfato de polimixina não-associado (livre); (2) Suspensão contendo sulfato de polimixina

associado; (3) Sobrenadante das nanocápsulas associadas ao sulfato de polimixina após centrifugação: 14.000 rpm por período de 2 horas; (4) Suspensão controle (ausência de sulfato de polimixina); E: ensaio realizado em triplicata; e (-) não detectado

5

TABELA 12

Suspensões	Sulfato de polimixina B (%)			
	E1	E2	E3	Média
1	97,6	98,1	95,1	96,9
2	45,1	43,9	42,2	43,7
3	43,2	42,4	44,2	43,3
4	-	-	-	-
Eficiência da associação: $[100 - (43,3 \times 100/96,9)] = 55,3\%$				

O valor médio de pH para a preparação contendo a suspensão de nanocápsulas com os ativos associados foi de 6,8. A determinação da osmolaridade revelou a isotonicidade da preparação.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, caracterizado pelo fato de compreender as etapas (a) adição da fase orgânica contendo polímeros de caprolactonas e polissacarídeos catiônicos sobre a fase aquosa contendo pelo menos um agente tensoativo hidrofílico etoxilado, (b) revestimento da vesícula nanométrica com biopolímero, (c) incorporação de polipeptídeos.

2. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa (a) ocorrer preferencialmente, sob agitação de cerca de 250 rpm, temperatura entre 37 e 40°C e por pelo menos 60 minutos.

3. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa (a) ainda compreender a eliminação do solvente e parte da água.

4. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do solvente compreender acetona, etanol e/ou mistura entre acetona, etanol e/ou água.

5. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa (b) de revestimento compreender concentrações da dispersão coloidal de quitosana de cerca de 1,87% (p/v) e da concentração final de cerca de 0,497% (v/v).

6. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato da etapa (b) de revestimento compreender particularmente uma agitação de 50 rpm por cerca de 60 minutos.

7. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa (c) de incorporação de peptídeos compreender preferencialmente, sulfato de polimixina B.

5 8. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato dos peptídeos ainda compreenderem peptídeos de origem natural e/ou sintética.

9. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 7 e 8, caracterizado pelo fato das quantidades de peptídeos compreenderem concentrações de 3.000UI/mL à 6.000UI/mL.

10. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da fase orgânica compreender lactonas, tais como, polímeros de caprolactona, preferencialmente, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), ácido láctico e glicólico, tais como, polímeros dos ácidos láctico e glicólico, preferencialmente, poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli(ácido láctico) (PLLA), acetona e outros solventes orgânicos tais como álcoois isolados e/ou em combinação com acetona, preferencialmente, acetona, ácidos cáprico e caprílico, tais como, triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, preferencialmente, mistura dos triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, ácidos oléico, mirístico, linoléico, linolênico, esteárico, palmítico, eicosanóico, eicosenóico, láurico, butírico.

25 11. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato da fase orgânica ainda compreender óleos vegetais, tais como, óleos de castanha do Brasil, açaí, buriti, pequi, tucumã, urucum, maracujá, coco de babaçu, oliva, girassol, soja, arroz, gergelim, palma, amêndoas

doces, manteigas de cacau, manteiga de cupuaçu, manteiga de murumuru e manteiga de ucuúba.

12. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado
5 pelo fato da fase orgânica ainda compreender agentes tensoativos lipofílicos, tais como, monoestearato e monooleato de sorbitol, álcool estearílico etoxilado com 2 e 20 mols de óxido de eteno, álcool cetoestearílico com 20 mols de óxido de eteno, mistura de éster graxo e ácido graxo etoxilado e mistura de álcool graxo etoxilado, fosfolipídeos
10 e/ou lecitina soja.

13. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do biopolímero da etapa (b) de revestimento compreender alginato, ácido hialurônico, polissacárideos de origem microbiana ou não e/ou
15 quitina, preferencialmente quitosana.

14. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da fase aquosa compreender agentes tensoativos hidrofílicos etoxilados, tais como, monolaurato de sorbitano etoxilado, monoestearato de
20 sorbitano etoxilado e monooleato de sorbitano etoxilado, preferencialmente, monoestearato de sorbitano etoxilado.

15. VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 1 a 14, caracterizadas pelo fato das vesículas anfifílicas compreenderem estruturas positivamente carregadas.

25 16. VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 15, caracterizadas pelo fato das vesículas compreenderem diâmetro de 100nm a 750nm, em particular, entre 300nm e 600nm, preferencialmente entre 450nm e 550nm.

17. VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 15 e 16, caracterizadas pelo fato das vesículas compreenderem um potencial zeta das nanoestruturas de +10,00 à +25,00 mV, particularmente, +17,00 mV e o diâmetro de aproximadamente 390 nm.

18. VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 15 a 17, caracterizadas pelo fato das vesículas compreenderem uma camada duplo-polimérica, carreadora simultânea de ativos com características hidrofílicas e hidrofóbicas.

19. VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 15 a 18, caracterizada pelo fato dos ativos da fase orgânica compreenderem dexametasona, antiglaucomas, antihipertensivos, antimaláricos e antiprotozoários, imunossuppressores, vitaminas, antivirais, analgésicos-antipiréticos, hormônios e antagonistas de hormônios, hipnóticos e sedativos, antidepressivos, ansiolíticos, anestésicos locais e gerais, antiarrítmicos, diuréticos, antieméticos, agentes anticolinesterásicos, simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos, agonistas e antagonistas dos receptores da serotonina, cardiotônicos, antiúlcera e anti-secretora ácida, anti-hipercolesterolêmicos, antidiarréicos, além de DNA, gene e peptídeos.

20. VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 15 a 19, caracterizada pelo fato dos ativos fase de revestimento compreenderem vacinas, antivirais e antiparasitários derivados de interferon, antidiabéticos, antimicrobianos, como derivados de prata, agentes antitumorais, por exemplo, derivados de platina e aminoácidos, agentes antireumáticos, tais como, derivados de ouro e/ou outros metais nobres, antineoplásicos incluindo os de base

de aminoácidos, antagonistas de bradicinina, antimicrobianos e/ou antiinflamatórios à base de peptídeos de origem sintética e/ou natural.

21. VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 15 a 20, caracterizada pelo fato das vesículas compreenderem pH próximo à neutralidade entre 5,5 a 7,5, preferencialmente 6,8.

22. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS, de acordo com as reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato das nanovesículas estarem compreendidas na forma de pós, cápsulas, comprimidos, comprimidos revestidos e drágeas; pó compactado e/ou não-compactado, pomadas, cremes, supositórios e óvulos, batom, desodorante e antitranspirante, protetor solar e sombra para olhos, emulsões e suspensões, máscara, protetor solar, produtos para barba e pós-barba, esmalte, antissépticos, errinos, otológicos, gotas orais e xaropes, xampú, tônico capilar, tônico facial, removedor de maquiagem, removedor de esmaltes, colírios, injetáveis de pequeno e grande volume, preferencialmente em suspensões e pomadas oftálmicas.

23. USO DAS VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 1 a 22, caracterizadas pelo fato de ser na aplicação em composições farmacêuticas e/ou cosméticas como agentes antineoplásicos, antimicrobiano e antiinflamatório.

24. USO DAS VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 23, caracterizadas pelo fato das composições farmacêuticas e/ou cosméticas compreenderem sistemas de liberação controlada, prolongada e/ou modificada dos ingredientes ativos.

25. USO DAS VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com as reivindicações 23 a 24, caracterizadas pelo fato de ser

preferencialmente na aplicação em suspensões oftálmicas no tratamento de infecções oculares.

26. USO DAS VESÍCULAS ANFIFÍLICAS, de acordo com a reivindicação 23, caracterizadas pelo fato das infecções serem causadas
- 5 por bactérias gram-negativas.

FIGURA 1

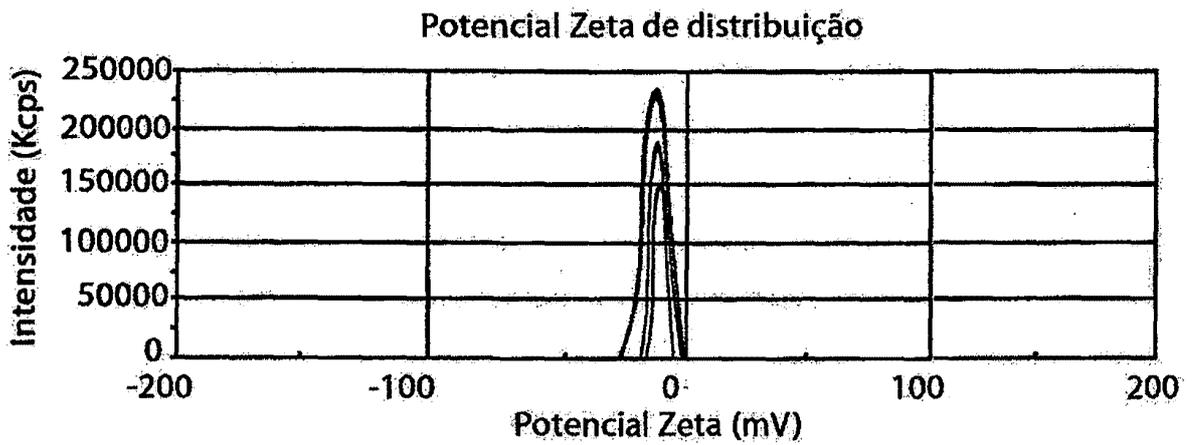
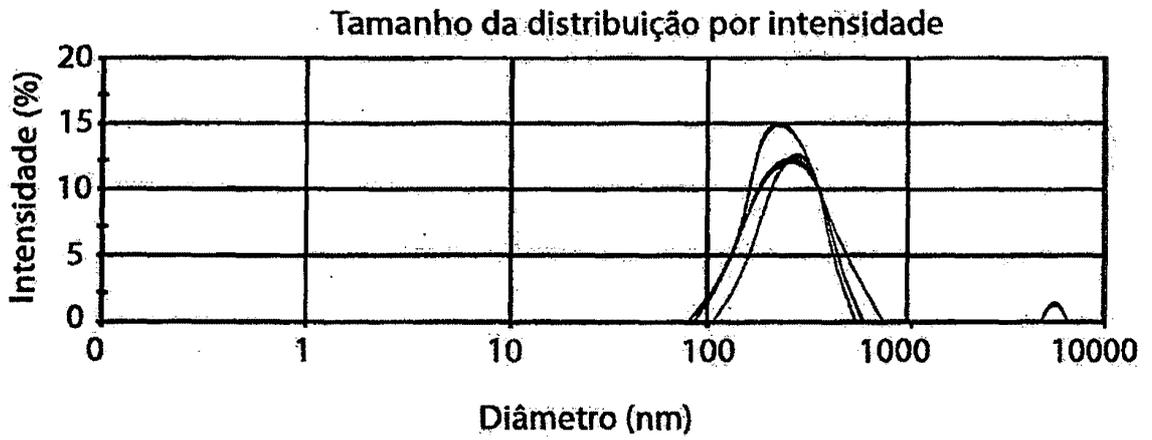


FIGURA 2a

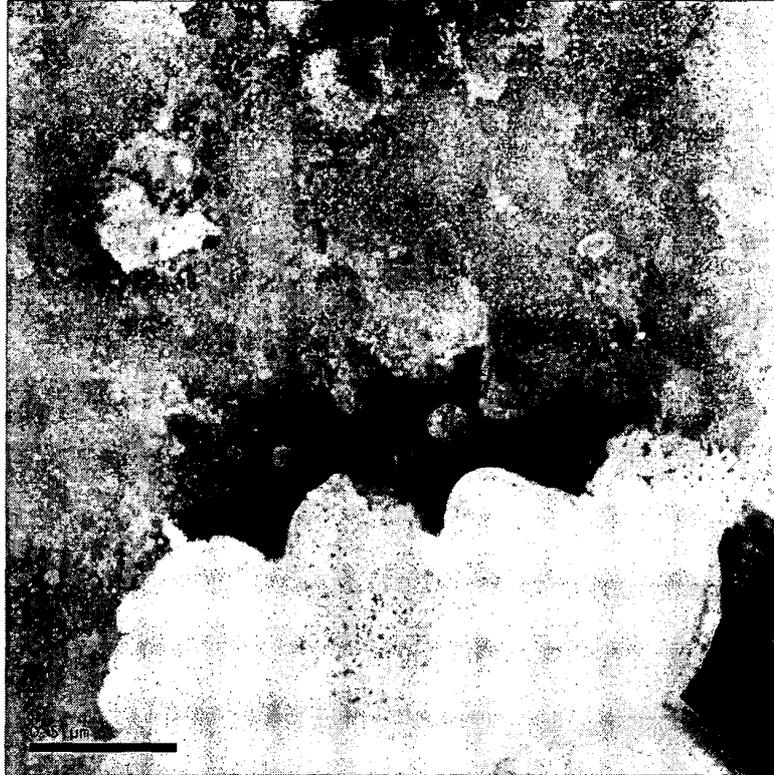


FIGURA 2b



FIGURA 3

Potencial zeta minimo

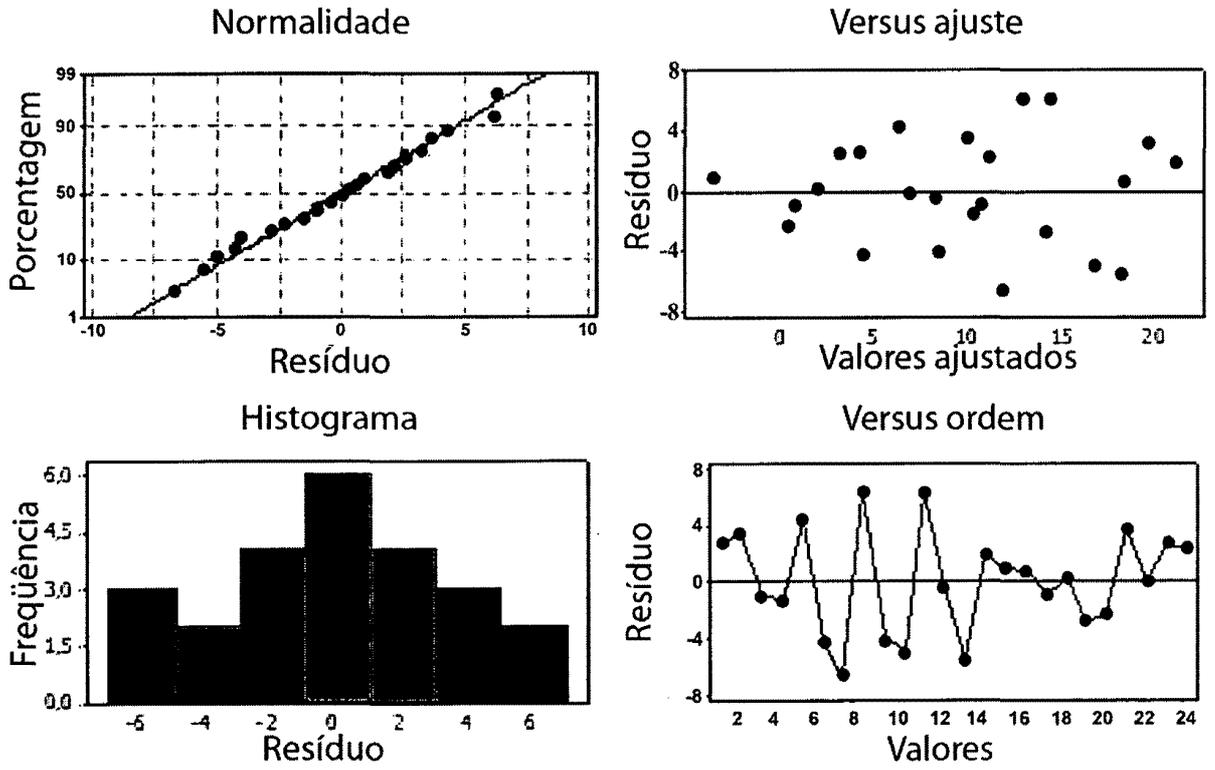


FIGURA 4

Residual por Diâmetro

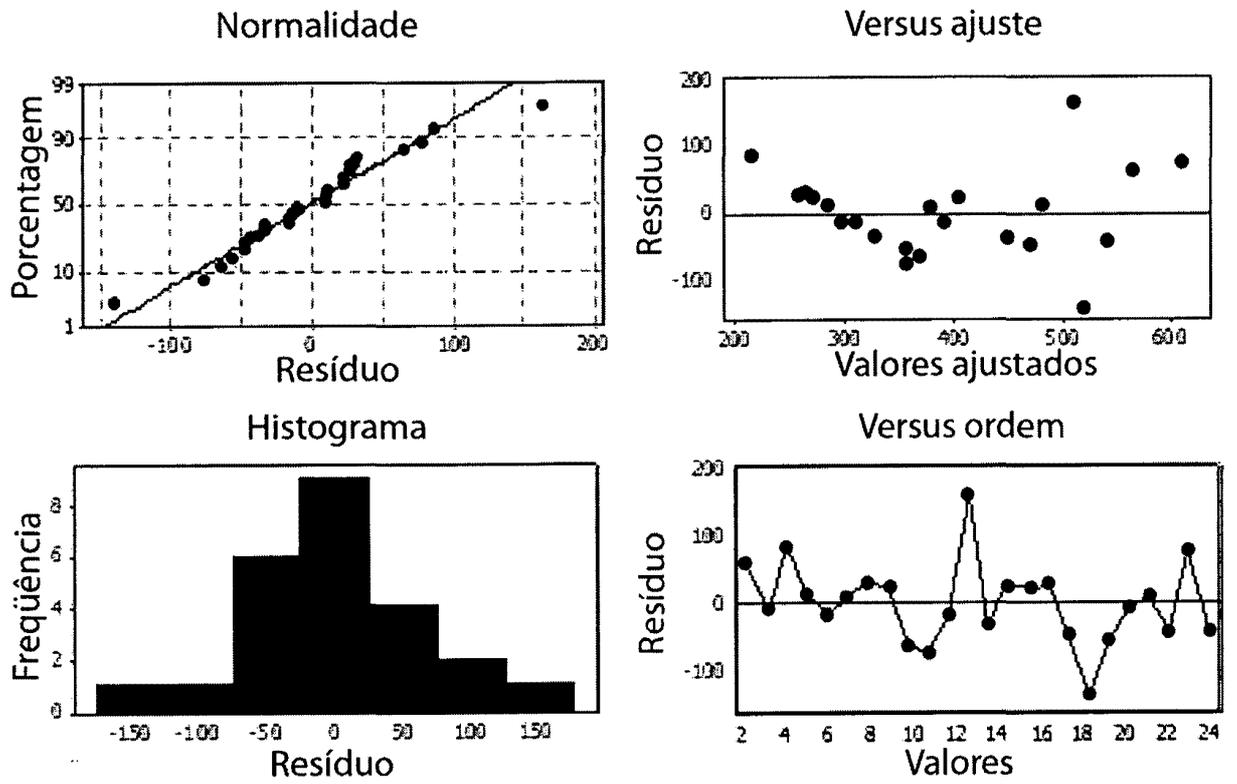


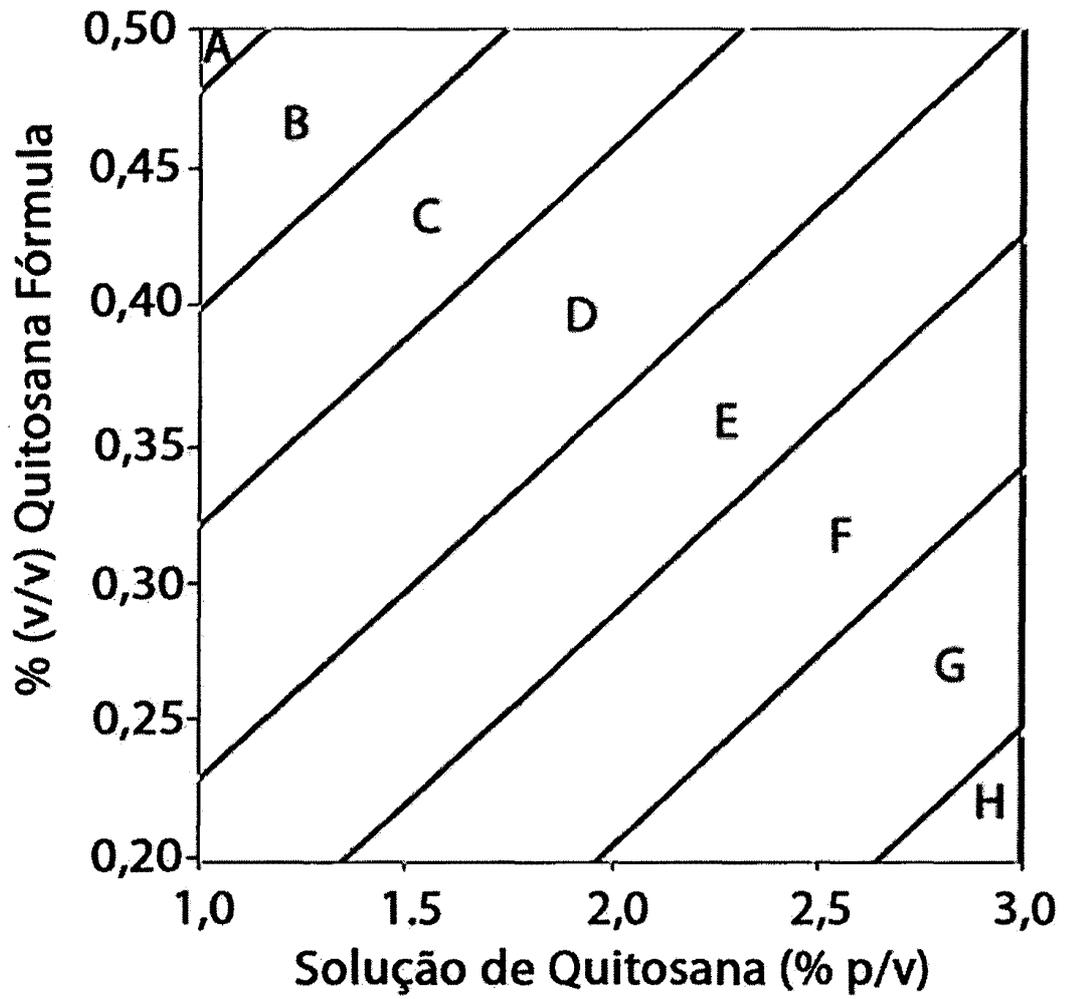
FIGURA 5

FIGURA 6

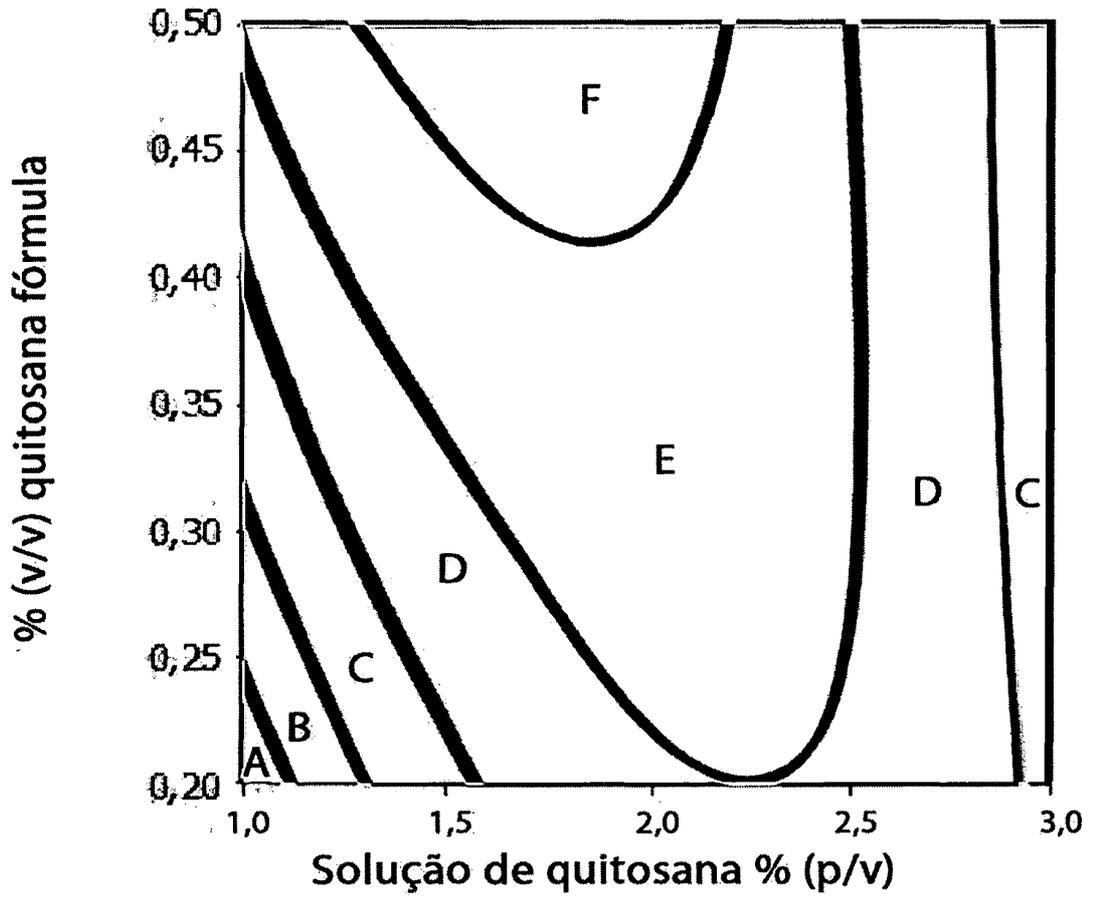


FIGURA 7

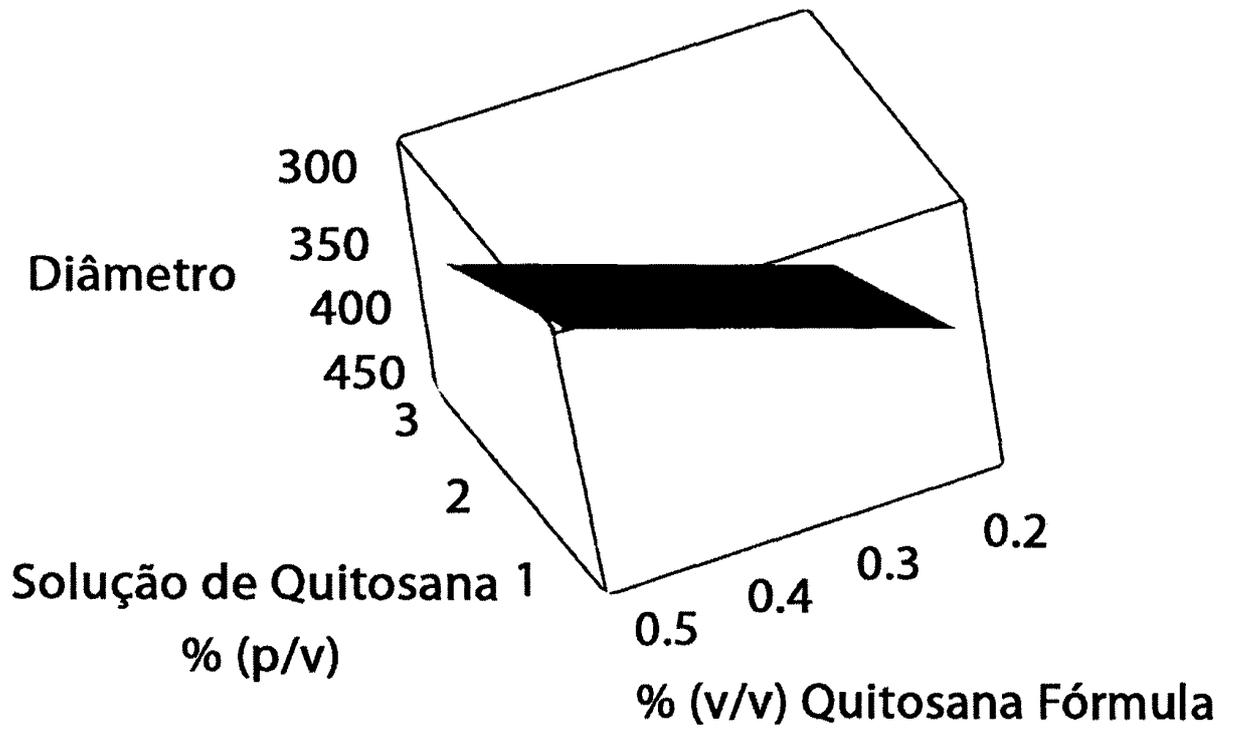


FIGURA 8

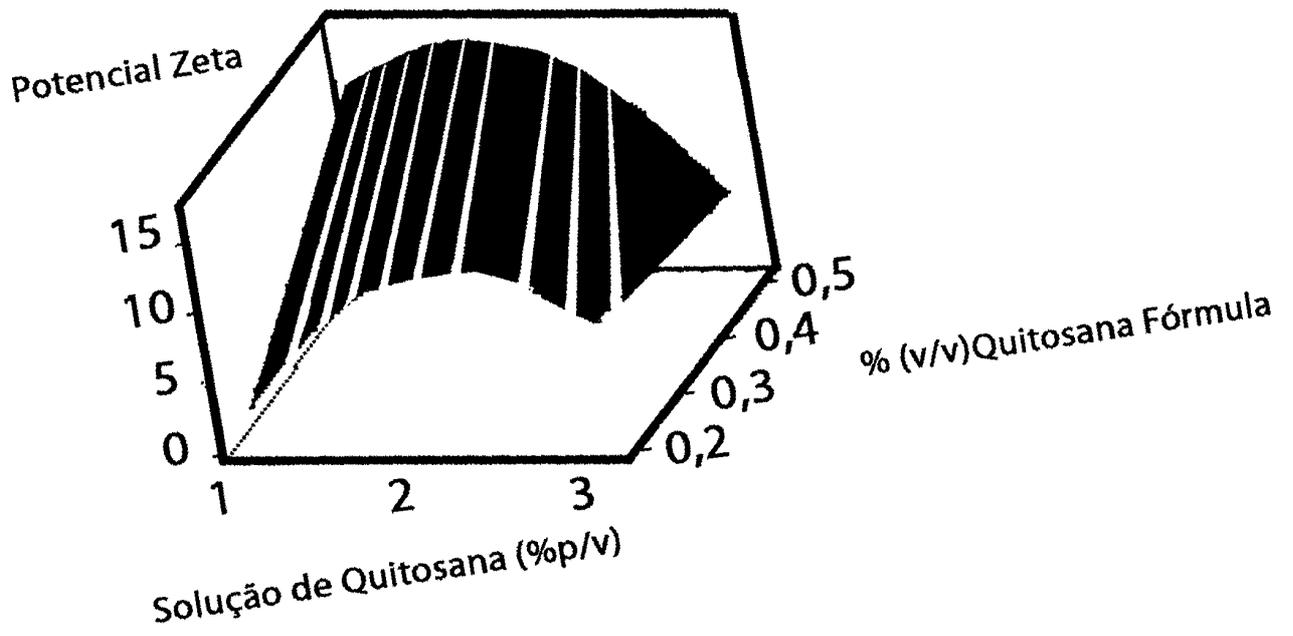


FIGURA 9

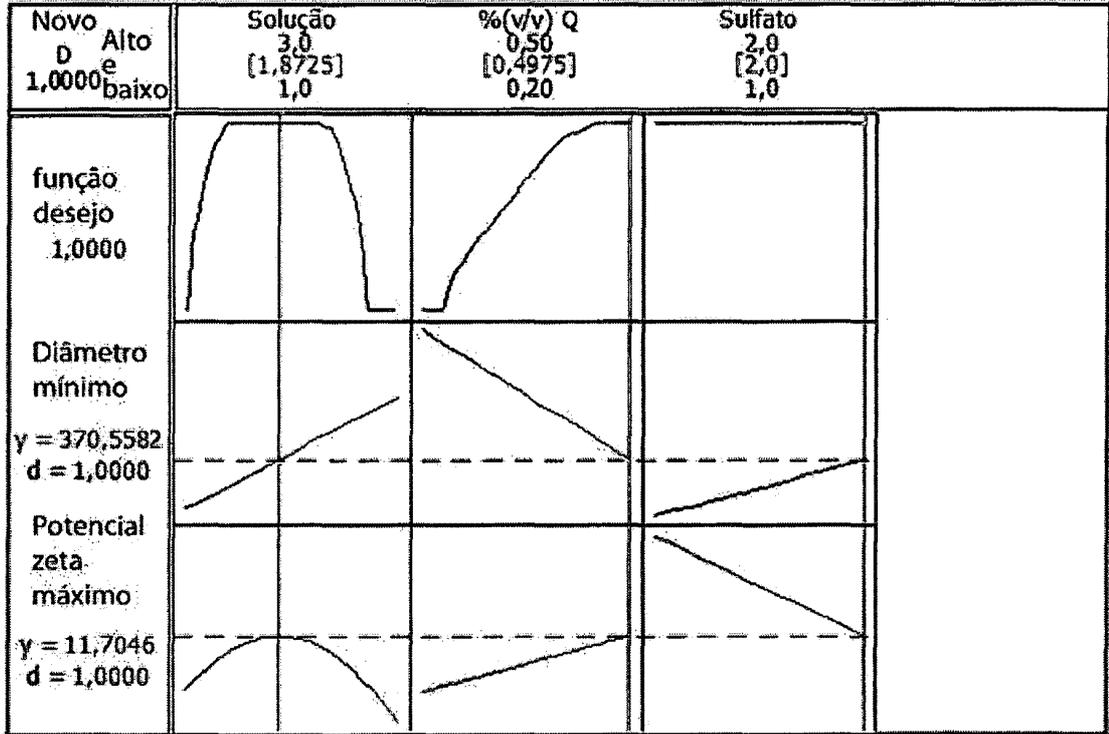


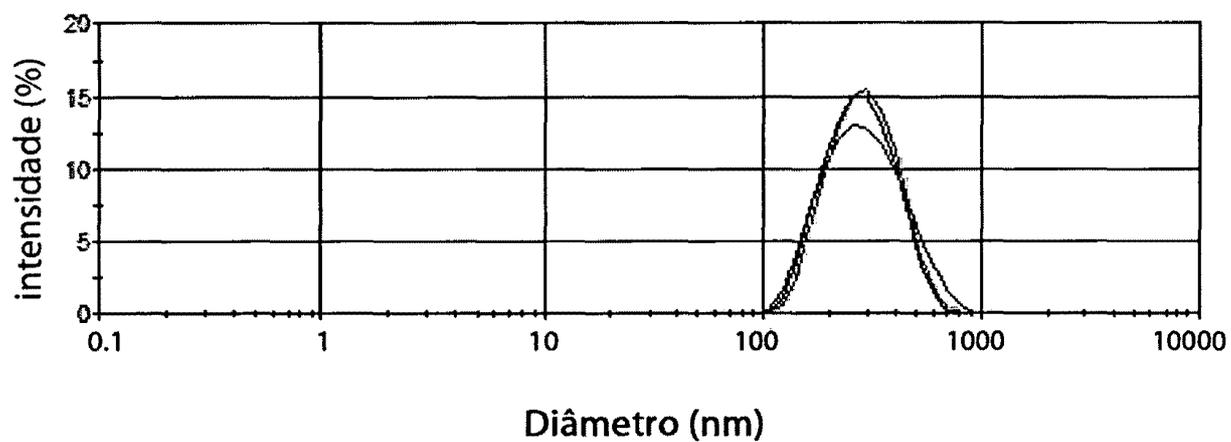
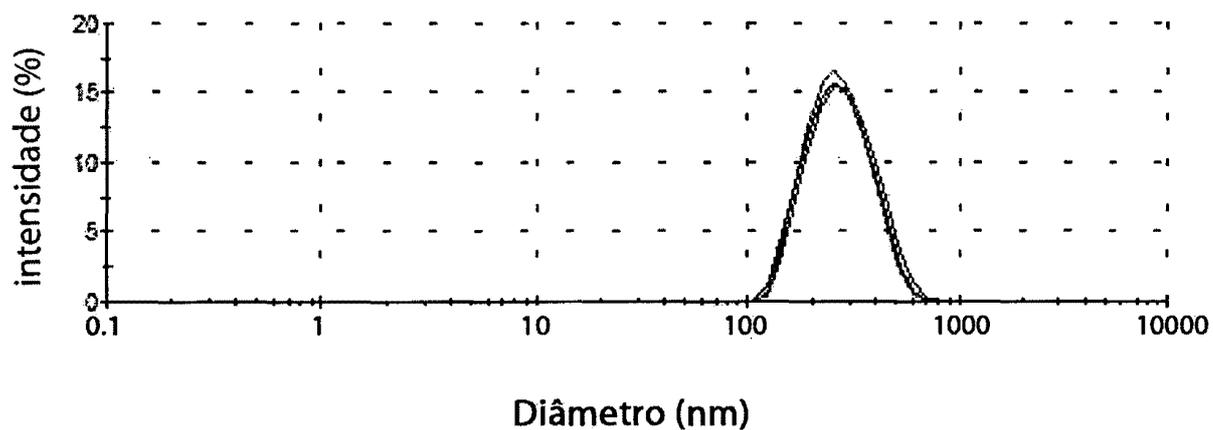
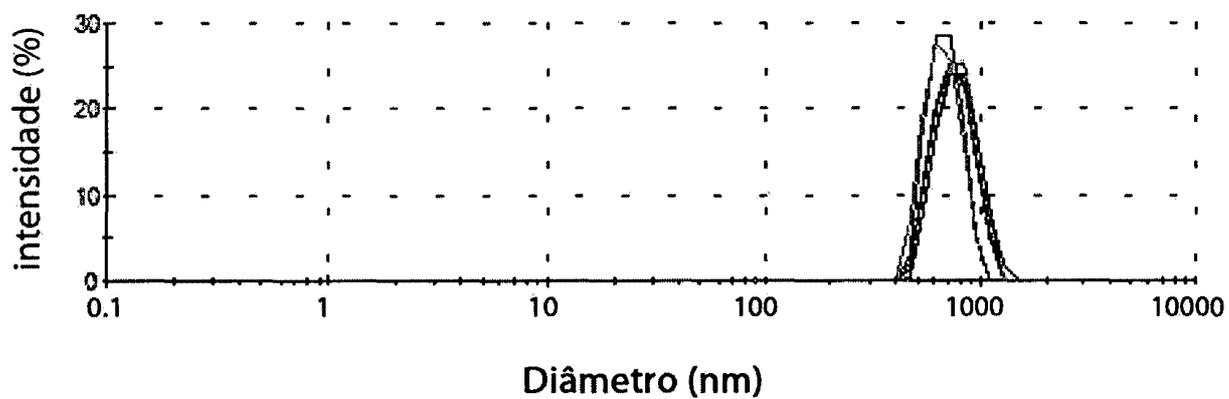
FIGURA 10a**FIGURA 10b****FIGURA 10c**

FIGURA 11a

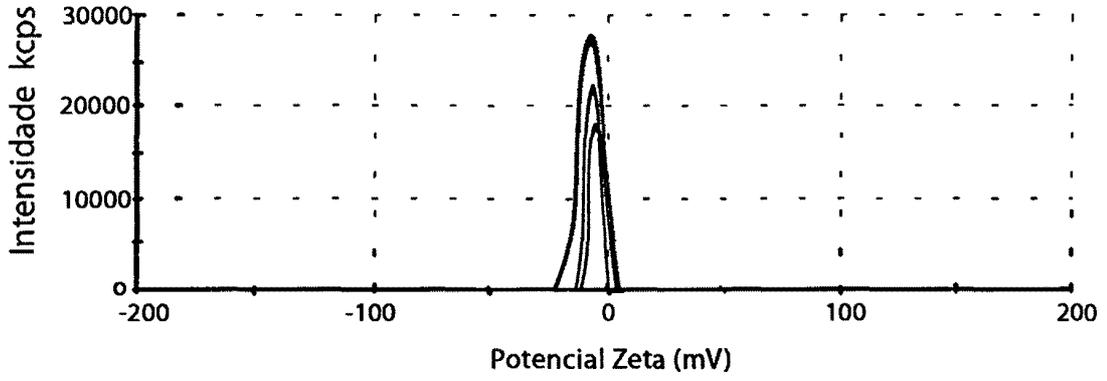


FIGURA 11b

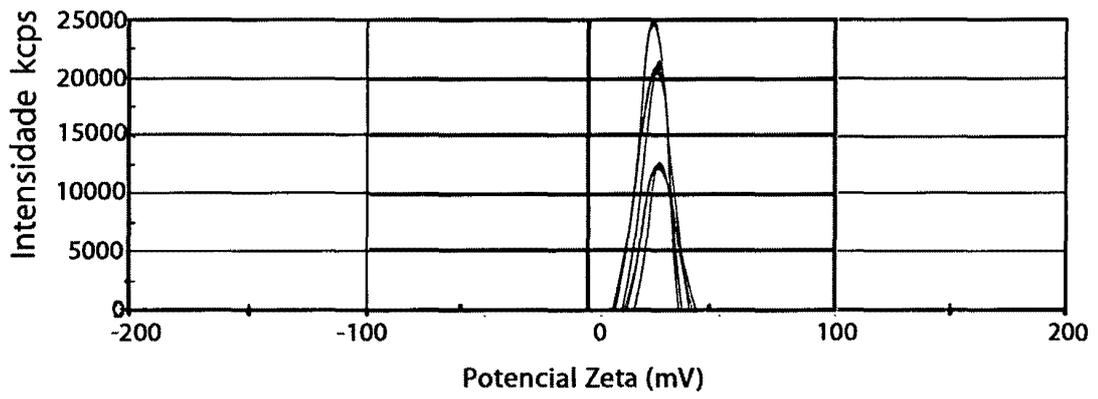


FIGURA 11c

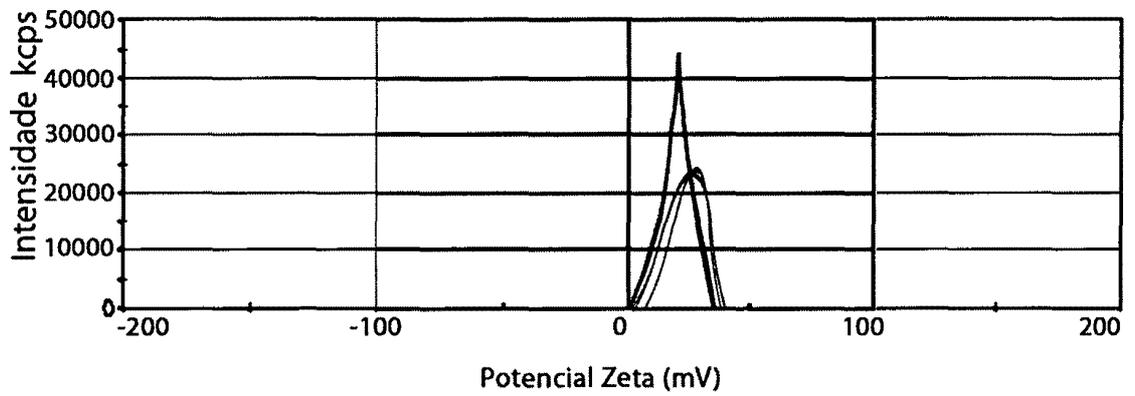


FIGURA 12a

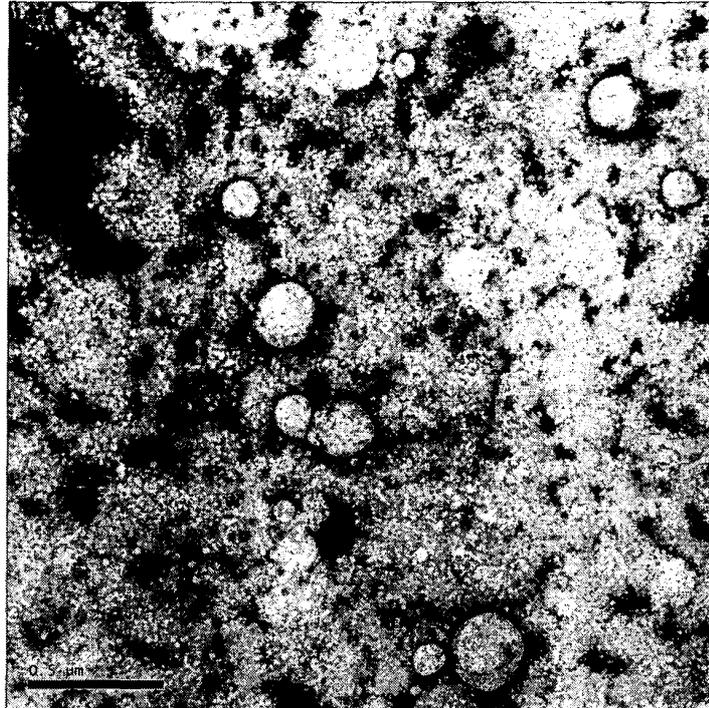


FIGURA 12b

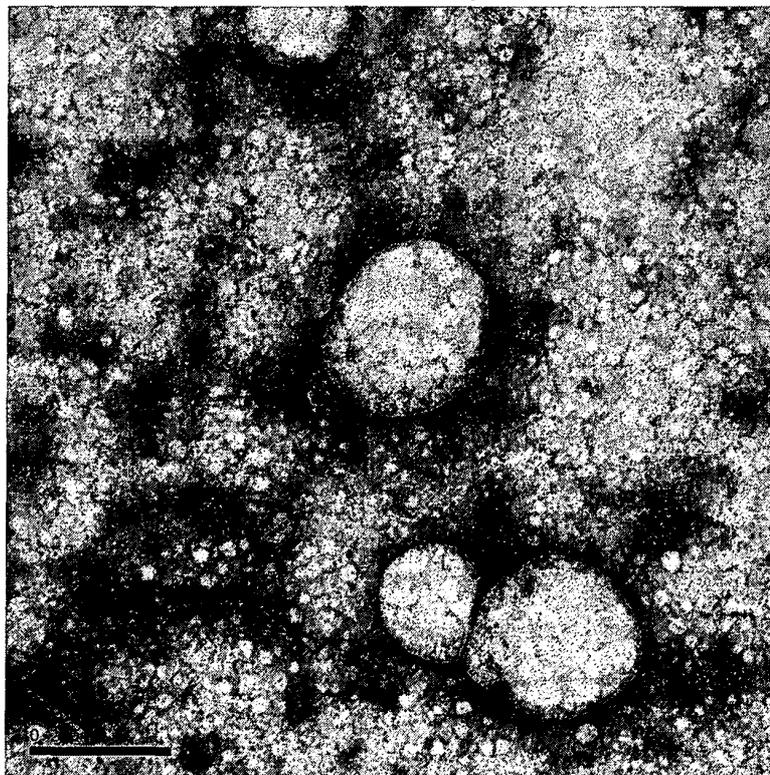


FIGURA 13a

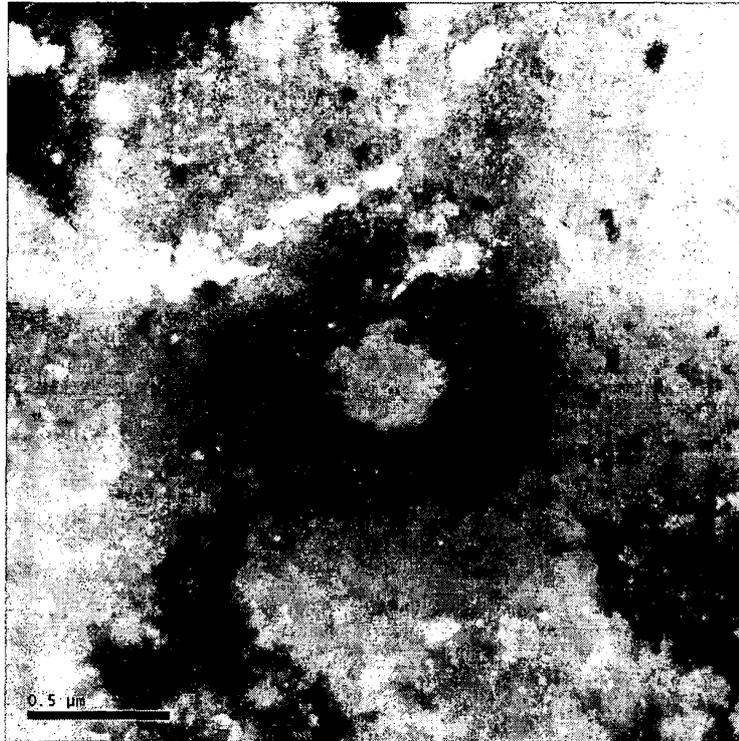


FIGURA 13b



FIGURA 14

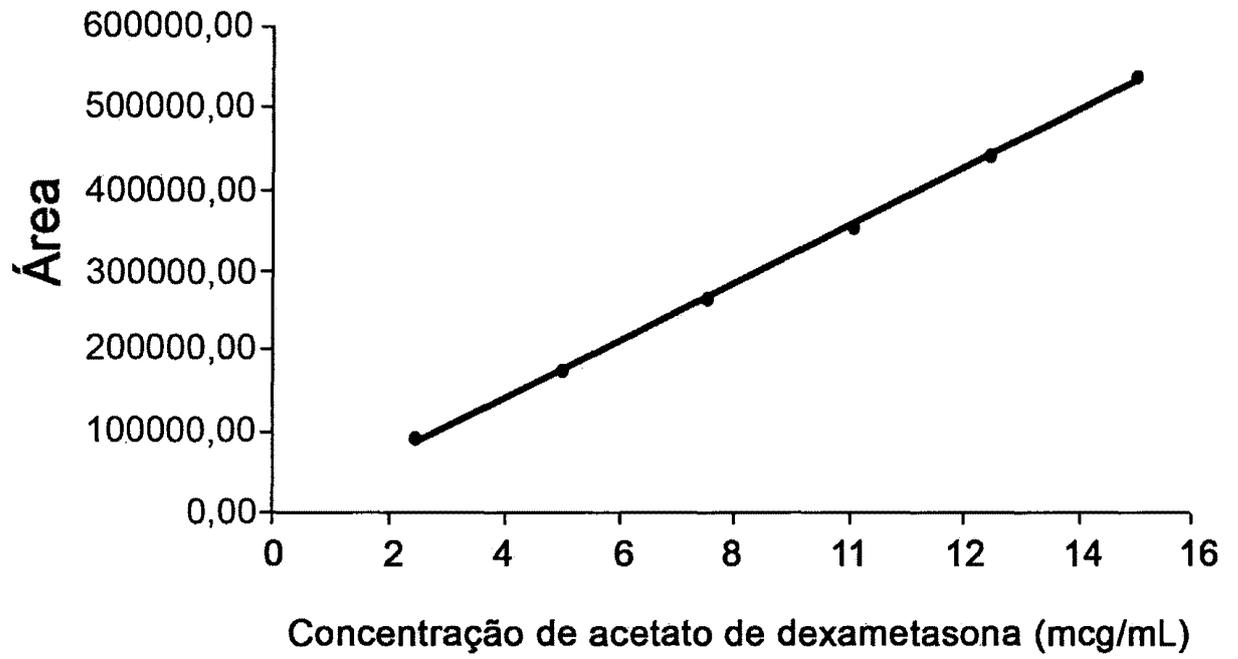
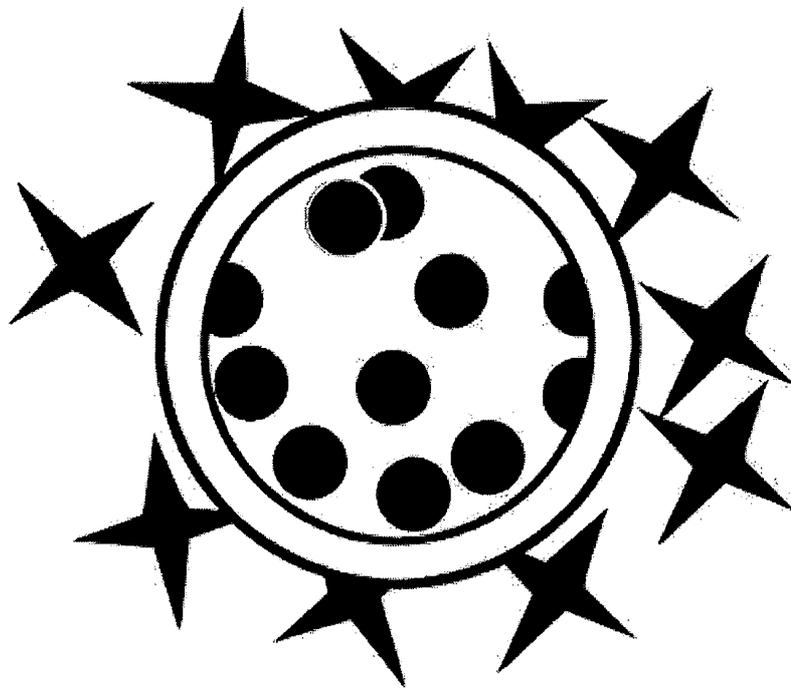


FIGURA 15



RESUMO**“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE VESÍCULAS ANFIFÍLICAS
POSITIVAMENTE CARREGADAS, VESÍCULAS ANFIFÍLICAS
POSITIVAMENTE CARREGADAS, SUAS COMPOSIÇÕES
5 FARMACÊUTICAS E/OU COSMÉTICAS E SEUS USOS”**

A presente invenção provê um método de obtenção de vesículas anfifílicas e vesículas anfifílicas com dupla camada poliméricas, positivamente carregadas contendo pelo menos dois ativos, com distintas solubilidades (hidrossolúveis e lipossolúveis).

10 Adicionalmente, o presente pedido destina-se a composições farmacêuticas e/ou cosméticas contendo as ditas vesículas anfifílicas e suas aplicações como agente antineoplásicos, antimicrobiano e antiinflamatório.