



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

(21) PI 0905347-6 A2



* B R P I 0 9 0 5 3 4 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 15/12/2009
(43) Data da Publicação: 02/07/2013
(RPI 2217)

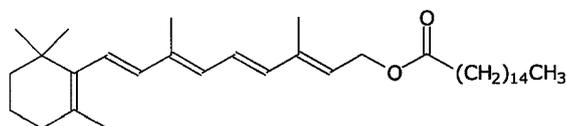
(51) *Int.Cl.:*
A61K 9/51
A61K 47/30
A61K 31/215
A61K 31/12
A61K 31/37
A61P 17/16

(54) **Título:** NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DEFORMÁVEIS NO ENCAPSULAMENTO DE BIOATIVOS

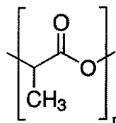
(73) **Titular(es):** Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

(72) **Inventor(es):** Nelson Eduardo Durán Caballero, Silvia Stanisçuaski Guterres, ZAINÉ TEIXEIRA CAMARGO

(57) **Resumo:** NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DEFORMÁVEIS NO ENCAPSULAMENTO DE BIOATIVOS. A presente invenção refere-se a uma nanocápsula deformável compreendendo uma parede polimérica de poli (D,L-lactídeo) (PLA) e um núcleo oleoso de palmitato de retinila que compreende um ou mais princípios ativos lipofílicos solúveis com característica de deformação, baixo índice de polidispersão, maior diâmetro comparadas com nanoesferas, alto índice de eficiência de encapsulamento, estáveis, elásticas e de baixa citotoxicidade. Dessa forma, o objeto da presente invenção pode ser de grande interesse para sistemas de liberação sustentada de fármacos ou ativos cosméticos por indústrias farmacêuticas e cosméticas.



PR



PLA



“NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DEFORMÁVEIS NO ENCAPSULAMENTO DE BIOATIVOS”

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção trata-se de um sistema de nanocápsulas com propriedade de deformação, o que torna esse sistema de grande interesse na passagem de barreiras biológicas, por exemplo, a permeação transepidermal, além da possibilidade de formação de filmes uniformes. As nanocápsulas foram produzidas a partir de um polímero biocompatível e biodegradável, o poli(D,L-
10 lactídeo) denominado PLA. O núcleo oleoso do dito sistema de nanocápsulas compreende substâncias ativas.

Dessa forma, esse sistema pode ser de grande interesse para sistemas de liberação sustentada de fármacos ou ativos cosméticos por indústrias farmacêuticas e cosméticas.

15

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Nanopartículas

As nanopartículas como carreadoras de fármacos tem se destacado nas últimas décadas devido à possibilidade da redução da toxicidade de drogas, liberação sustentada, aumento da eficácia do medicamento, diminuindo as
20 quantidades terapêuticas necessárias, além da possibilidade de passagem por barreiras biológicas (Panyman e Labhasetwar, Adv. Drug Del. Rev. 55, 329-347, 2003; Vauthier, C. e Bouchemal, K. Pharm. Res., 26, 1025-1058, 2009.). No contexto de permeação cutânea, os nanocarreadores tem se destacado
25 pela possibilidade de uma maior permeação do bioativo (Guterres *et al.*, Drug Target Insights 2, 147-157, 2007; Hoet *et al.*, J. Nanobiotech. 2, 12-26, 2004).

Na tecnologia farmacêutica, as nanopartículas são definidas como sistemas coloidais submicrométricos, geralmente na faixa de 10 a 1000nm (Soppimath *et al.*, J. Control. Rel. 70, 1-20, 2001).

30

A nanotecnologia farmacêutica teve início em 1968 com os lipossomas como carregadores de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos (Sessa e Weissman, J. Lipid Res. 9, 310-315, 1968). No final dos anos 70, surgiram as



nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos lipofílicos (Couvreux *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 31, 331-332, 1979). Na década de 1990, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), lipídios sólidos a temperatura corporal, foram propostas como carreadores de fármacos e cosméticos (Schwarz *et al.*, J. Control. Release, 30, 83-96, 1994), porém apresentaram limitações quanto à expulsão prematura da droga. Este problema foi resolvido através do uso de uma mistura de lipídios, incluindo lipídios líquidos no sistema, sendo que este sistema foi denominado carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) (Müller *et al.*, Adv. Drug Del. Rev., 54, S131–S155, 2002). Quando comparada aos lipossomas, as nanopartículas poliméricas apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e no armazenamento, além de sua preparação apresentar uma maior facilidade de escalonamento (Quintar-Guerrero *et al.*, Drug Dev. Ind. Pharm. 24, 1113-1128, 1998).

Nas nanopartículas poliméricas, o agente terapêutico pode ficar encapsulado em um núcleo oleoso (nanocápsulas) ou disperso na matriz (nanoesferas), além de poder estar adsorvido ou ligado quimicamente na superfície de nanopartículas (Schaffazick *et al.*, Quím. Nova 26, 726-737, 2003).

Um dos métodos de preparação comumente empregado na obtenção desses sistemas é o método de nanoprecipitação, patenteado (EP0274961 Process for preparing a colloidal and disperse system in the shape of nanocapsule, Hatem Fessi, Francis Puisieux and Jean-Philippe Devissaguet, 1987) e posteriormente publicado por Fessi *et al.* (Int. J. Pharm. 55, R1-R4, 1989). Tal método, na produção de nanocápsulas, consiste em uma fase orgânica contendo um solvente miscível em água, um óleo, ativo lipofílico e opcionalmente, um surfactante lipofílico. Essa fase orgânica é adicionada a uma fase aquosa, que pode conter um surfactante hidrofílico. Posteriormente, o solvente orgânico é removido, obtendo a suspensão aquosa de nanopartículas. Este método apresenta como vantagens facilidade de escalonamento, o uso de solventes não tóxicos, além de uma boa reprodutibilidade. Além disso, tem sido empregada industrialmente, uma vez que a patente de Fessi *et al.* foi licenciada

pela L'Oreal para a produção de nanocápsulas poliméricas no início dos anos 90 (Guterres *et al.*, Drug Target Insights 2, 147-157, 2007).

Os polímeros comumente empregados na preparação das nanopartículas poliméricas são o poli(D,L-lactídeo) (PLA), poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL), sendo biocompatíveis e biodegradáveis com resíduos não tóxicos (Panyman e Labhasetwar, Adv. Drug Del. Rev. 55, 329-347, 2003).

Devido ao aumento da área superficial das nanopartículas poliméricas pela redução dos diâmetros ocorre um aumento da tensão superficial do sistema o que favorece a coalescência das nanopartículas. Dessa forma, o uso de tensoativos, tipicamente entre 0,2 e 2,0 % (m/m), é comumente necessário para aumentar a estabilidade física das partículas (Legrand *et al.*, S. T. P. Pharm. Sci. 9, 411-418, 1999; Quintar-Guerrero *et al.*, Drug Dev. Ind. Pharm. 24, 1113-1128, 1998). Dentre os estabilizantes mais empregados, destaca-se o álcool polivinílico (PVA) que, no entanto, tem seu uso restrito pela Food and Drug Administration (FDA), não podendo ter aplicação intravenosa. Os polaxamers, também conhecidos como Pluronic, são amplamente empregados, pois apresentam baixa citotoxicidade. Os polisorbatos (Tweens e Spans), permitidos pela FDA, são surfactantes não iônicos, encontrando-se nesta classe surfactantes que podem ser solubilizados na fase aquosa ou orgânica (Quintar-Guerrero *et al.*, Drug Dev. Ind. Pharm. 24, 1113-1128, 1998).

Núcleos oleosos

As nanocápsulas apresentam como principal vantagem uma maior quantidade de droga incorporada em relação às nanoesferas. O núcleo oleoso é formado por um óleo solubilizando o ativo geralmente inerte, como o Miglyol 810 ou Miglyol 812® (Guterres *et al.*, Drug Target Insights 2, 147-157, 2007; Schaffazick *et al.*, Quím. Nova 26, 726-737, 2003). Em princípio, outros óleos podem ser empregados no núcleo oleoso, desde que o polímero da parede das nanocápsulas não seja solúvel em tal óleo.

O óleo palmitato de retinila é a forma mais estável de armazenamento de vitamina A que apresenta importante papel na diferenciação celular, bem como prevenção de câncer epitelial (Kurlandsky *et al.*, J. Biol. Chem. 271,



15346-15352, 1996). Além disso, outros trabalhos relatam a possibilidade de uso do palmitato de retinila como fotoprotetor, sendo demonstrada a prevenção de eritema, perda de água transepidermal e queimadura solar em camundongos sem pelos (Antille *et al.*, J. Invest. Dermatol. 121, 1163-1167, 5 2003). Dessa forma, o palmitato de retinila apresenta amplo uso em formulações cosméticas, principalmente em cremes anti-rugas. Entretanto, a aplicação do palmitato de retinila não se restringe apenas a aplicações cosméticas por apresentar importantes funções biológicas, além de poder atuar em efeito sinérgico quando em combinação com outros bioativos como, por 10 exemplo, flavonóides. No entanto, este óleo, o palmitato de retinila, não foi observado em aplicação em nanocápsulas empregando o polímero PLA.

Permeação cutânea

No que se refere à aplicação cutânea, a pele em sua camada mais externa, camada córnea, apresenta uma estrutura do tipo tijolos-cimento, 15 aonde os tijolos são as células de queratinócitos e o cimento os lipídios que unem estas células. O mecanismo de permeação pode ser, portanto, intercelular (através do cimento) ou intracelular (através dos tijolos). Outro mecanismo importante é via apêndices, que é basicamente formado pelos folículos pilossebáceos que representam apenas em torno de 1% da superfície 20 da pele, além de permeação através de poros finos em média de 30 nm, influenciada por gradiente de pressão transepidérmico, ou seja, sem oclusão (Trotta *et al.*, Int. J. Pharm. 2002, 241, 319-327; Wertz e Downing, Stratum Corneum: biological and biochemistry consideration. In: Hadgraft, J., Guy, R. H. (Eds), Transdermal Drug Delivery: Development Issues and Research 25 Initiatives. Marcel Dekker: New York, 1989).

Os mecanismos pelo quais os nanocarreadores aumentam a permeação cutânea não são totalmente elucidados, porém algumas propriedades, além do tamanho, como carga superficial e lipofilicidade são importantes no perfil de permeação (Hoet *et al.*, J. Nanobiotech. 2, 12-26, 2004). No que se refere a 30 carga, nanopartículas de látex positivas, negativas e neutras de tamanhos 50, 100, 200 e 500 nm foram estudadas na permeação cutânea e somente as nanopartículas negativamente carregadas de 50 e 500 nm permearam



totalmente a pele, sendo detectadas na solução receptora em experimentos utilizando células de difusão vertical de Franz (Kohli e Alpar, *Int. J. Pharm.* 275, 13-17, 2004). Os autores sugeriram uma carga limite que deve ser alcançada para permitir a passagem de partículas através de canais temporais formados por repulsão entre os lipídios da pele e as partículas, levando à permeação. Em outro estudo de permeação por técnica de microscopia de varredura a laser confocal (CLSM), as imagens revelaram que o corante vermelho do Nilo encapsulado em PCL (250 nm) alcançou camadas mais profundas da pele quando comparadas ao corante não-encapsulado (Alvarez-Román *et al.*, *Pharm. Res.* 21, 1818-1825, 2004). Em um estudo subsequente, partículas fluorescentes de poliestireno entre 20 e 200 nm foram empregadas para se verificar a distribuição na pele, sendo que se observou um acúmulo maior das partículas nos folículos ao invés de uma permeação uniforme. Baseado neste trabalho os autores sugeriram que em seu trabalho anterior (com corante vermelho do Nilo) as nanopartículas não permearam a pele e sim permitiram uma liberação uniforme do modelo lipofílico (Alvarez-Román *et al.*, *J. Contr. Rel.* 99, 53-62, 2004). As nanopartículas poliméricas de poliésteres, em princípio, por não ter íons não apresentam carga formal. No entanto, as nanocápsulas, objeto desta invenção, assim como os demais poliésteres relatados na literatura apresentam potencial zeta (carga no raio hidrodinâmico da partícula) ligeiramente negativo decorrente de grupos hidrolisados dos poliésteres localizados na superfície das nanopartículas (Ahlin *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 239, 113-120, 2002).

Nanopartículas de PLGA foram investigadas aumentando a permeação de ácido flufenâmico. Somente a droga apresentou maior permeação, sendo que as nanopartículas ficaram retidas na camada mais externa da pele. Além disso, o pH influenciou no gradiente de concentração desta droga a partir das camadas mais externas (camada córnea) em direção a derme (Luengo *et al.*, *Skin Pharmacol. Physiol.* 9, 190-197, 2006). Dessa forma, os resultados da literatura indicam que o aumento de permeação da droga empregando nanopartículas poliméricas ocorre devido à formação de um filme sobre a pele, decorrente da retenção das nanopartículas, que diminui a perda de água



transepidérmica e favorece a liberação do ativo uniformemente. A vantagem das nanocápsulas ora apresentadas em relação a demais sistemas poliméricos, como de PLGA, é uma maior permeação em barreiras biológicas devido a capacidade de deformação das mesmas. As partículas de PLGA supracitadas, por exemplo, não permeiam a pele e ficam retidas na superfície. A vantagem das nanocápsulas, objeto desta invenção e que não utiliza PLGA, é a de maior permeação do nanocarreador do ativo, possibilitando a liberação em camadas ainda mais profundas da pele.

Outros nanocarreadores, no entanto, como os lipossomas elásticos, são conhecidos por permearem a pele uniformemente permitindo uma aplicação transdérmica (Trotta *et al.*, Int. J. Pharm. 241, 319-327, 2002; Bouwstra e Honeywell-Nyguen, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, S41-S55, 2002). Quando comparadas aos lipossomas, as nanocápsulas poliméricas, objeto desta invenção, apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e no armazenamento, além de sua preparação apresentar maior facilidade de produção em larga escala.

Recentemente, polimerossomas (vesículas de copolímero em bloco policaprolactona-poli(etileno)glicol-policaprolactona) foram relatadas para aumento de permeação cutânea, devido à capacidade de deformação das partículas observadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), pela possibilidade de passagem do carreador através de poros da pele (Rastogi *et al.*, Colloid Surf. B-Biointerfaces, 72, 161-166, 2009). Este sistema apresenta núcleo aquoso, portanto, mais eficiente no armazenamento de moléculas hidrofílicas, enquanto que o presente invento tem como proposta o encapsulamento de moléculas hidrofóbicas por compreender núcleo oleoso.

A possibilidade de uso de nanopartícula polimérica em que o carreador pode apresentar capacidade de deformação, similarmente aos lipossomas elásticos mostra-se de extrema importância na permeação de barreiras biológicas, principalmente no que se refere a aplicações transdérmicas. Uma das possíveis vantagens das nanocápsulas poliméricas, ora apresentadas, em relação aos lipossomas elásticos é uma liberação mais lenta do ativo. Os lipossomas por serem sistemas auto-organizados, apresentam reorganização



das camadas bilipídicas bastante dinâmicas o que favorece a expulsão do ativo.

A patente US7498045 (Chang, Thomas M. S.; Yu, Wei-Ping; Powanda, Douglas. Polymeric nanocapsules and uses thereof. Data de depósito: 5 28/08/2002) refere-se a nanocápsulas de co-polímero biodegradável poli(D,L-lactídeo)-polietilenoglicol (PLA-PEG) preparadas encapsulando hemoglobina como exemplo de macromolécula. A principal proposta desta tecnologia é um aumento no tempo de circulação das nanocápsulas devido à presença de PEG. Inclui um método de preparação mais complexo que vai desde a síntese do co-10 polímero ao posterior aumento do tempo de residência da hemoglobina por adição de agentes de reticulação. As nanocápsulas deste sistema não são deformáveis, utiliza vários materiais de formulação distintos dos empregados na presente invenção, tendo apenas o PLA como reagente comum e não propõe uso em aplicação dérmica. O fato de se utilizar várias etapas e vários 15 reagentes, além de aumentar o custo do processo, aumenta a possibilidade de etapas falhas, por exemplo, inativação do ativo encapsulado devido ao uso de reagente de reticulação.

As características de deformação são importantes tanto para aumento de capacidade de formação de filmes uniformes quanto para aumento de 20 permeação em barreiras biológicas, como permeação cutânea. Característica elástica em sistemas poliméricos foi observada anteriormente apenas em micelas de policaprolactona-polietilenoglicol-policaprolactona, as quais diferem da presente invenção pelo tipo de material empregado e pela estrutura (sistema auto-organizado), além de não apresentar núcleo oleoso (Rastogi *et al.*, Colloid Surf. B-Biointerfaces, 72, 161–166, 2009). Outros sistemas que 25 apresentam característica elástica são alguns lipossomas (Cevic e Blume, Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. 1104, 226-232, 1992) e SLN (Müller e col., Eur. J. Pharm. Biopharm., 50, 161-177). As nanocápsulas de PLA, objeto desta invenção, apresentam características de deformação, o que lhes 30 conferem possibilidade de atingir camadas mais profundas da pele e o carreamento do palmitato de retinila como núcleo oleoso em uma nanocápsula



é um de seus diferenciais, permitindo a liberação tanto da vitamina A quanto de outras moléculas de bioativos solubilizadas no núcleo oleoso.

O documento EP1342471-1 (Simonnet, Jean-Thierry; Guerin, Gilles. Nanocapsules based on polyol polyester, and cosmetic and dermatological compositions containing same. Data de depósito: 09/10/2003) apresenta 5 nanocápsulas contendo uma parede polimérica de poliéster-poliol obtido por policondensação para o encapsulamento de retinol ou seus ésteres nas nanocápsulas para uso cosmético ou dermatológico. Como núcleo oleoso, propõe o uso de óleos convencionais, como o óleo de jojoba e óleo de rícino. 10 Os inventores sugeriram um aumento na permeação cutânea das nanocápsulas baseados somente no tamanho submicrométrico (menor que 1 μm), porém nenhum exemplo de concretização foi realizado demonstrando a penetração na pele e muito menos o aumento de permeação. Além disso, as nanocápsulas não são deformáveis, de maneira que as nanocápsulas da 15 presente invenção apresentam-se mais promissoras quanto à permeação cutânea.

A patente EP1316301-A (Duranton, Albert; Renault, Beatrice; Mahe, Yann; Marion, Catherine; Catroux, Philippe. Cosmetic or dermatological composition containing a retinoid and/or a carotenoid and acexamic acid. Data 20 de depósito: 04/06/2004) descreve o uso de palmitato de retinila em associação com ácido acexamico em uma formulação cosmética, apresentando como vantagem melhoria na reepitelização cutânea, no entanto difere da presente invenção, pois não trata-se de nanocarreadores e a formulação difere da 25 composição da presente invenção, tendo como componente comum somente o palmitato de retinila. A formulação da presente invenção apresenta como principal vantagem em relação a este trabalho o direcionamento do palmitato de retinila a camadas mais profundas da pele, o que significa em um aumentando da eficácia do palmitato de retinila.

A patente EP0557489 (Ribier, Alain; Richart, Pascal; Handjani, Rose- 30 Marie. Composition Providing a Lasting Cosmetic and/or Pharmaceutical Treatment of the Upper Epidermal Layers by Topical Application on the Skin. Data de depósito: 01/03/1992) emprega um polímero não-biogradável na



obtenção de nanocápsulas poliméricas justificado pelo aumento do tempo de liberação do fármaco. Entretanto, o perfil de liberação pode ser tanto por difusão quanto por degradação e, no geral, a difusão é mais rápida do que degradação, ou seja, tal invenção não aumenta o tempo de residência de todos os ativos (devido a difusão) e ainda cria um problema que é a utilização de um plástico não-degradável que não se sabe se e quando ocorrerá sua eliminação caso absorvido.

Diante de todo estado da técnica a presente invenção traz vantajosamente uma proposta de nanocápsulas poliméricas de PLA e núcleo oleoso de palmitato de retinila com característica de deformação, baixo índice de polidispersão, maior diâmetro comparadas com nanoesferas, alto índice de eficiência de encapsulamento, estáveis, elásticas, baixa citotoxicidade entre outras atribuições descritas posteriormente. É um objeto adicional dessa invenção a possibilidade de adicionar um ou mais princípios ativos lipossolúveis em palmitato de retinila, selecionados dentre benzofenoma e baicaleína, no entanto sem restringir. Dessa forma, as nanocápsulas ora apresentadas são de grande interesse para indústrias farmacêuticas e cosméticas.

20 BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Nanocápsulas deformáveis compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo uma razão óleo/polímero que varia preferencialmente entre 2,5/1,0 e 3,5/1,0 m/m, um núcleo oleoso contendo um ou mais princípios ativos lipofílicos aceitáveis, como, por exemplo benzofenona e baicaleína, em em pelo menos um reagente selecionado do grupo: solvente orgânico miscível em água, solvente orgânico imiscível em água, surfactante e mistura entre eles, um índice de polidispersão baixo, um diâmetro médio de partícula que varia de 182,7 a 285,8 nm, elástico, uma faixa aceitável analiticamente de recuperação de palmitato de retinila em relação à quantidade inicial, uma eficiência de encapsulamento de 99,9% e um potencial zeta negativo. Dessa forma, o objeto da presente invenção pode ser



de grande interesse para sistemas de liberação sustentada de fármacos ou ativos cosméticos por indústrias farmacêuticas e cosméticas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

5 **Figura 1:** apresenta as estruturas químicas dos principais componentes do sistema: palmitato de retinila (PR) e poli(D,L-lactídeo) (PLA).

Figura 2: apresenta exemplos de concretização da estabilidade normal e acelerada das nanocápsulas com e sem antioxidantes em função da porcentagem de palmitato de retinila nanoencapsulado em um tempo
10 determinado de armazenamento em relação ao teor do mesmo princípio ativo no tempo inicial. NC corresponde a nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST corresponde a nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

Figura 3: apresenta o exemplo de concretização da estabilidade das nanocápsulas em relação ao pH do presente invento em função do tempo. NC
15 corresponde a nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST corresponde a nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

Figura 4: apresenta os valores medidos de potencial zeta das nanocápsulas em função do tempo. NC corresponde a nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST corresponde a nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

20 **Figura 5:** apresenta a distribuição de diâmetros de nanocápsulas de palmitato de retinila em relação ao tempo. NC corresponde a nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST corresponde a nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

Figura 6: apresenta os ensaios de citotoxicidade das nanocápsulas de
25 palmitato de retinila em culturas de principais células encontradas na pele: fibroblastos e queratinócitos. A linhagens celulares utilizadas foram fibroblastos de embrião de camundongo (BALB/c 3T3) e de queratinócito humano (HaCaT).

Figuras 7A-D: apresentam as imagens de microscopia eletrônica de
30 transmissão (TEM) de: (A) niossomas (Span 60), (B) nanoesferas, (C) nanoemulsão em relação às (D) nanocápsulas do presente invento.



Figura 8A-B: Apresenta a deformação das nanocápsulas (A) e a comprovação do mecanismo proposto de deformação (B-C) através das nanocápsulas secas com vizinhança (B) e secas isoladas (C).

Figura 9: apresenta as curvas de histerese do comportamento reológico das nanocápsulas (NC) incorporadas ao gel em comparação ao gel sem a adição das nanocápsulas.

Figura 10: apresenta testes de permeação durante a aplicação da composição compreendendo nanocápsulas palmitato de retinila, objeto deste invento em pele humana abdominal após 24 h de permeação.

Figura 11: apresenta os resultados da permeação da BZ3 encapsulada em nanocápsulas de palmitato de retinila (NC) e nanoesferas (NS) em pele humana abdominal após 24 h de permeação em célula de difusão vertical de Franz.

Figura 12: apresenta um esquema representativo de imagem obtida por microscopia de varredura a laser confocal (CLSM) em ensaios de permeação em pele humana em célula de difusão vertical de Franz por 4 horas, analisada em seccionamento óptico do microscópio no eixo de profundidade na pele (X,Z). Da imagem original, pele corresponde a ausência de fluorescência nas condições empregadas (preto); palmitato de retinila corresponde a imagem verde; palmitato de retinila mais PLA-azul do Nilo corresponde a verde mais vermelho, respectivamente corresponde a imagem cor-de-laranja.

Figura 13: Perfil de liberação da benzofenona (BZ3) livre, incorporada em nanoemulsões (NEBZ3), nanocápsulas (NCBZ3) e nanoesferas (NSBZ3).

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma nanocápsula deformável compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila. É um objeto adicional da presente invenção uma nanocápsula deformável conforme descrito anteriormente compreendendo um núcleo oleoso contendo um ou mais princípios ativos lipofílicos solúveis em palmitato de retinila. Para efeito de concretização da presente invenção



princípios ativos foram selecionados dentre benzofenoma e baicaleína, sem no entanto restringir.

O objeto da presente invenção retrata o uso de nanocápsulas deformáveis compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo uma razão óleo/polímero que varia preferencialmente entre 2,5/1,0 e 3,5/1,0 m/m, um núcleo oleoso contendo um ou mais princípios ativos lipofílicos aceitáveis em um solvente orgânico e um surfactante, um índice de polidispersão que varia preferencialmente de 0,07 a 0,19, um diâmetro médio de partícula que varia de 182,7 a 285,8 nm, um valor de elasticidade que compreende $31,8 \pm 6,8$, uma faixa de recuperação de palmitato de retinila em relação à quantidade inicial entre 90 e 110 %, uma eficiência de encapsulamento de 99,6 a 99,9% e um potencial zeta que varia entre $-32,0 \pm 4,4$ mV e $-7,2 \pm 5,2$ mV.

Um objeto adicional da presente invenção retrata o uso de nanocápsulas deformáveis compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo benzofenona na preparação de um cosmético para ser aplicado como protetor solar para aplicação dérmica e uso de nanocápsulas deformáveis compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo um princípio ativo selecionado do grupo dos flavonóides preferencialmente baicaleína na preparação de um medicamento antiinflamatório e antioxidante para aplicação dérmica ou parenteral.

A Figura 1 apresenta a estrutura química da nanocápsula da presente invenção.

Na presente invenção consideram-se as seguintes definições: poli (D,L-lactídeo) denominado PLA, palmitato de retinila denominado PR, baicaleína denominado BAI, benzofenona-3 denominado BZ3, nanocápsulas denominado NC, nanoesferas denominado NS, nanoemulsões denominado NE, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxi-tolueno denominado BHT, tampão fosfato salino denominado PBS, polioxietilenoglicol 8-lauril denominado PEG-8L, linhagem celular de fibroblastos de embrião de camundongo denominado BALB/c 3T3, linhagem celular de queratinócitos humano denominado HacaT, vermelho neutro



denominado VN, dicicloexilcarbodiimina denominado DCC, nanopartículas lipídicas sólidas denominado SLN, carreadores lipídicos nanoestruturados denominado NLC, poli(lactídeo-co-glicolídeo) denominado PLGA, poli(ϵ -caprolactona) denominado PCL, álcool polivinílico denominado PVA, Food and drug administration denominado FDA, ultravioleta denominado UV, microscopia de varredura a laser confocal denominado CLSM, microscopia eletrônica de transmissão denominado TEM, cromatografia líquida de alta eficiência denominado HPLC, espalhamento de luz dinâmico denominado DLS, índice de polidispersão denominado PDI.

10 O processo de preparação das composições das nanocápsulas é conhecido do estado da técnica, solubiliza-se um óleo, preferencialmente o palmitato de retinila e opcionalmente, um agente ativo lipofílico aceitável em um solvente orgânico miscível em água (acetona), com ou sem a adição de um surfactante. Esta fase orgânica é adicionada a uma fase aquosa sob agitação
15 magnética, na qual se adiciona um surfactante em concentração igual ou superior a 0,2 % (m/V). O solvente orgânico é posteriormente removido e a suspensão aquosa concentrada sob evaporação a pressão reduzida. Neste método, as nanocápsulas são formadas pela precipitação de seus componentes na forma de nanocápsulas, a partir da insolubilidade alcançada
20 na difusão do solvente orgânico para a fase aquosa. Solventes orgânicos imiscíveis em água (como clorofórmio) também podem ser empregados, mas neste caso utiliza-se outro método de produção como emulsificação em que gotículas da fase orgânica em água de tamanhos submicrométricos são formadas a partir de métodos de alta energia (Ultraturrax®, por exemplo),
25 sendo que as nanocápsulas são formadas durante a evaporação do solvente.

A suspensão final de nanocápsulas pode ser seca por métodos como *spray-drying* ou utilizadas diretamente na obtenção da formulação final como semi-sólidos para uso tópico.

30 Exemplos



A presente invenção será descrita a seguir em termos de exemplos não limitativos de sua concretização preferida.

Exemplo 1: Nanocápsula deformável compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila.

5 A preparação das composições de nanocápsulas deformáveis compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila foi realizada através de técnicas convencionais relatadas acima.

10 Exemplo 2: Nanocápsula deformável compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo benzofenona.

O filtro UV benzofenona-3 (BZ3) foi encapsulado no sistema de nanocápsulas deformáveis através da solubilização do bioativo na fase orgânica na preparação das nanocápsulas conforme descrito anteriormente.

15

Exemplo 3: Nanocápsula deformável compreendendo uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo baicaleína.

20 O flavonóide baicaleína (BAI) foi encapsulado no sistema de nanocápsulas deformáveis através da solubilização do bioativo na fase orgânica na preparação das nanocápsulas conforme descrito anteriormente.

Caracterização físico-química das composições das nanocápsulas

25 Na preparação de nanocápsulas do presente invento, testaram-se formulações com razão óleo/polímero entre 2,5/1,0 e 3,5/1,0 (m/m). Em todos os sistemas ocorreu a formação de nanocápsulas, a qual é indicada pelo baixo índice de polidispersão (P.D.I. < 0,2), além do maior diâmetro em relação às nanoesferas (Tabela 1, medidas por espalhamento de luz dinâmico, DLS).



Desta forma optou-se por uma formulação intermediária para prosseguir os exemplos (óleo/polímero = 3,0/1,0 m/m).

Tabela 1. Diâmetros médios de partículas (d) e polidispersidades (P.D.I.) das preparações NS, NC1, NC2 e NC3.

| Preparações | | | Diâmetros | |
|-------------|----------------|----------------------|-----------|--------|
| | | | d / nm | P.D.I. |
| NS | Nanoesferas | (sem adição de óleo) | 125,7 | 0,154 |
| NC1 | Nanocápsulas | 2,5/1,0 | 238,3 | 0,112 |
| NC2 | (óleo/polímero | 3,0/1,0 | 261,5 | 0,104 |
| NC3 | m/m) | 3,5/1,0 | 265,9 | 0,075 |

5 Os resultados da Tabela 1 são referentes a matéria prima de mesmo lote. Quando se varia o lote de polímero, por exemplo, têm-se modificações nos diâmetros e potenciais zeta, sendo que, nesses casos foram encontradas amostras NC com diâmetros de 182,7 nm a 285,8 nm, índices de polidispersidades entre 0,07 e 0,19 e potencial zeta entre $-32,0 \pm 4,4$ mV e $-7,2 \pm$
10 5,2 mV.

A eficiência de encapsulamento para esta formulação foi determinada por método de centrifugação/filtração em membrana Millipore Microcon 100 kDa. O filtrado foi injetado em método analítico por HPLC, quantificando-se o ativo "livre" (não encapsulado). A quantidade total de palmitato de retinila na
15 formulação foi determinada após dissolução de 100 μ L de suspensão em 10 mL de acetonitrila. A quantidade de palmitato de retinila foi determinada entre 90 e 110 % da quantidade inicial (faixa de recuperação aceitável pelo método analítico), indicando que não ocorrem perdas do ativo durante a preparação. A eficiência de encapsulamento foi determinada pela quantidade de ativo livre/
20 quantidade de ativo total (x100). A eficiência de encapsulamento foi de 99,9%.

O potencial zeta (medida da carga na superfície de cisalhamento da partícula no raio hidrodinâmico) foi determinado através de medida da mobilidade eletroforética em equipamento ZetaSizer NanoZs. Obteve-se potencial zeta aproximadamente de -20 mV. O potencial zeta negativo refere-se à carga formada por hidrólise do polímero PLA (poliéster) que gera grupos
25 carboxílicos. Os surfactantes empregados (não iônicos), Polaxamer 188 ou



Polissorbato 80, não influenciam significativamente para valores negativos, sendo que o principal mecanismo de estabilização das nanocápsulas, neste caso, além de estabilização por carga, é por efeitos estéricos (efeito osmótico) e camada de hidratação (aumento da distância entre as partículas), conferida pelos estabilizantes.

O tipo de surfactante empregado, não influenciou significativamente na distribuição de diâmetros das partículas, obtendo-se diâmetros efetivos de 219,7 nm e 219,6 nm, utilizando polissorbato 80 ou polaxamer 188 (1 % m/v), respectivamente. Além disso, a obtenção de nanocápsulas com mesma distribuição de diâmetros foi possível sem a adição de surfactante hidrossolúvel. No entanto, essa suspensão coalesce aproximadamente uma hora após o preparo. Na verdade, a presença de tensoativos não é um fator primordial na formação dos sistemas coloidais. Eles conferem maior estabilidade, prevenindo a agregação com o passar do tempo (estabilidade cinética).

Quanto à estabilidade química (Figura 2) avaliada por HPLC observou-se que, mesmo encapsulado, o palmitato de retinila apresenta uma degradação rápida em função do tempo. Foi possível, no entanto, estabilizar as suspensões formadas através da adição de um estabilizante lipossolúvel, di-terc-butil-4-hidroxi-tolueno (BHT), e um filtro solar, Tinogard Q (citrato de tris(tetrametil-hidropiperidinol, o qual reduz o potencial para reação de degradação por minimizar a vida média dos estados excitados intermediários), ambos a 0,1% (m/V). Somente na avaliação de estabilidade "acelerada", ou seja, a 42°C observou-se perda de palmitato em um mês, sendo equivalente a 25% da quantidade inicial. Em 3 meses (120 dias), observa-se uma quantidade menor do que 10% de palmitato de retinila no ensaio a 42 °C.

Com relação ao pH das suspensões (Figura 3), observa-se que o estabilizante hidrofílico eleva o pH das suspensões inicialmente e protege a suspensão. Sem estabilizante ocorre uma diminuição do pH das suspensões e com temperatura mais elevada ocorre degradação. No sistema de nanocápsulas Mygliol 810 em PLA também se observou o decréscimo do pH

em função do tempo pela degradação do polímero (Guterres e col., Int. J. Pharma. 113, 57-63, 1995).

5 A estabilidade física das partículas foi avaliada quanto aos diâmetros médios e potencial zeta. Os dados de potencial zeta apresentam um decréscimo em função do tempo no primeiro mês (Figura 4), o que indica a presença de ácidos carboxílicos gerados na superfície das nanopartículas induzindo carga negativa na superfície de cisalhamento (raio hidrodinâmico).

10 Com relação aos diâmetros médios (Figura 5), observa-se que com o passar do tempo pelo menos até 1 mês de análise não ocorre grandes variações nos tamanhos com exceção das amostras armazenadas em geladeira, sendo que as nanocápsulas sem estabilizantes aumentam de tamanho já nos tempos iniciais. Tais medidas foram realizadas para as amostras contendo polaxamer 188. Cabe mencionar que para amostras contendo Tween 80, os diâmetros se mantêm constantes por pelo menos 4 meses da preparação.

Citotoxicidade

20 A Figura 6 apresenta os resultados de ensaios de citotoxicidade realizados em linhagens de queratinócitos humanos HaCaT e fibroblastos de embriões de camundongos BALB/c 3T3. As células foram semeadas em placas de 96 poços e uma concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL e incubadas a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , durante 24 h. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos surfactantes e incubadas por 24 h. A seguir, a proliferação celular foi avaliada através da captação de vermelho neutro (VN: cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina). Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%) e representam média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes realizados em sextuplicata. As formulações de nanocápsulas apresentaram citotoxicidade (46 % de viabilidade celular) apenas na concentração mais alta testada ($1140 \mu\text{mol L}^{-1}$) em linhagem de queratinócitos.

30 Uma vez que as linhagens testadas apresentam boa correlação com os queratinócitos e fibroblastos presentes na pele humana, pode-se sugerir que as nanocápsulas apresentam-se seguras para a aplicação dérmica.

Caracterização morfológica

Para efeito de comparação das nanocápsulas com demais estruturas, preparou-se também nanoesferas, niossomas e nanoemulsão pelo mesmo método de preparação, sendo que as nanoesferas são obtidas pela omissão do óleo, na nanoemulsão não se utiliza o polímero, e nos niossomas omite-se o

5 óleo e o polímero, tendo-se apenas estruturas formadas a partir de surfactantes.

A Figura 7 apresenta a imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanoesferas de PLA (branco sem óleo), da

10 nanoemulsão (sem polímero), niossomas (sem polímero e óleo) e das nanocápsulas obtidas. Nesse caso, o mecanismo de deformação é comprovado na Figura 8, na qual se observa que somente as partículas secas na vizinhança (Figura 8-A) apresentam deformação enquanto que esferas secas isoladas permanecem esféricas (Figura 8-B). Observa-se que ao

15 contrário das nanoesferas e da nanoemulsão, as nanocápsulas apresentam característica de deformação, sendo que ao secar sobre o porta-amostras, o efeito de adesão capilar, segundo a equação de Young-Laplace, permite que elas se deformem sem que ocorra coalescência das partículas (Adamson, Physical chemistry of surfaces, 6th ed.; John Wiley & Sons: New York, 1997).

20 Passagem por membranas sintéticas de policarbonato

A pele humana possui poros de diâmetros médios de 30 nm, com uma pressão externa de 2,5 atm. Dessa forma, na literatura, a elasticidade de lipossomas elásticos foi determinada através da mimetização de passagem por poros da pele (Trotta e col., Int. J. Pharm. 241, 319-327, 2002; Bouwstra e

25 Honeywell-Nyguen, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, S41-S55, 2002). O método consiste na extrusão das partículas em duas membranas de policarbonato sobrepostas sob pressão transepidérmica. Utilizaram-se duas membranas sobrepostas de policarbonato (50 nm de diâmetro, Osmonics Inc.) para simulação da tortuosidade da pele em duas pressões diferentes 2,5 e 6,0 atm

30 gerada por $N_{2(g)}$. As nanocápsulas, embora deformáveis (conforme observado nas imagens de TEM das Figuras 7 e 8), não passaram pela membrana. Para aumentar a molhabilidade deste sistema, utilizou-se polioxietilenoglicol 8-lauril



(PEG-8L) a (0,2 % m/V), o qual é comumente empregado na produção de lipossomas elásticos (Cevc e col., BBA-Biomembranes, 1564, 21-30, 2002).

Desta forma, a passagem das nanocápsulas foi possível, sendo que os resultados de partículas que permearam as membranas (extrudado) em relação às suspensões iniciais e ao que ficou retido nas membranas são apresentados na Tabela 2. Ambos os experimentos, sob 2,5 atm e 6,0 atm, resultaram no mesmo perfil de permeação com fluxos de 20 g/h/cm² e 38 g/h/cm², respectivamente. O valor de elasticidade compreende 31,8 ± 6,8.

Tabela 2. Dados de diâmetros e polidispersidades (P.D.I.) em estudo de permeação em membranas sintéticas.

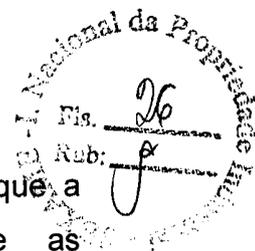
| | Diâmetros médios / nm (P.D.I.) | | |
|---------------------|--------------------------------|--------------------|----------------------|
| | Suspensões iniciais | extrudado | Retido nas membranas |
| NC | 227,(0,12) | (não-determinável) | 231,6(0,16) |
| NC + PEG-8L 2,5 atm | 220,0 (0,11) | 296,0 (0,54) | 604,3(0,61) |
| NC + PEG-8L 6,0 atm | 215,7 (0,07) | 295,7 (0,27) | 608,1(0,55) |

Cabe mencionar que o PEG-8L, apesar de ser empregado acima de sua concentração micelar crítica não é detectado por DLS quando filtrado devido à diluição posterior do filtrado para análise, ou seja, as partículas medidas na suspensão são de fato as nanocápsulas. Apesar da elasticidade das nanocápsulas, há a necessidade de uso do PEG-8L para passagem em poros sintéticos, a qual possivelmente pode estar relacionada com fenômenos de repulsão capilar devido a baixa molhabilidade das partículas para passagem pelos poros de menores tamanhos na ausência desse surfactante.

Os dados das Figuras 7 e 8 e Tabela 2 permitem sugerir que o sistema nanocápsulas pode ser classificado como elástico, tendo em vista que a diferença de pressão originada pela diminuição das gotas durante o processo de secagem das partículas sobre o porta-amostra (forças de adesão capilar, ΔP), além da pressão transepidérmica nos ensaios em membranas, é suficiente para deformar as partículas.

Incorporação em formulação semi-sólida

Testou-se também a possibilidade de se empregar as suspensões em formulações semi-sólidas. As curvas de histerese do comportamento reológico



das formulações semi-sólidas são apresentadas na Figura 9, sendo que a incorporação das nanopartículas não alterou significativamente as características reológicas do sistema. O gel de Carbopol 940 empregado apresentou comportamento de viscosidade do tipo tixotrópico, ou seja, aumentando o torque empregado, ocorre uma diminuição da viscosidade (P. M. Alves e col., Pharmazie 60, 900-904, 2005). Esse comportamento reológico é de grande importância para produtos durante a aplicação tópica, podendo ser classificado como de fácil aplicação.

Utilização das nanocápsulas para o encapsulamento de bioativos

Dois bioativos modelos foram encapsulados no sistema de nanocápsulas deformáveis: o filtro UV benzofenona-3 (BZ3) e o flavonóide baicaleína (BAI). O método de preparação das nanocápsulas consistiu na solubilização do bioativo na fase orgânica na preparação das nanocápsulas.

A Tabela 3 mostra as principais características físico-químicas do sistema (tamanho e potencial zeta) e a incorporação de bioativos com alta eficiência de encapsulamento.

As nanocápsulas apresentam como principal vantagem uma maior incorporação da droga em relação às nanoesferas. A incorporação da droga não alterou significativamente os diâmetros de partículas e potencial zeta.

Tabela 3. Eficiência de encapsulamento, Distribuição de diâmetros e potencial zeta para os sistemas de nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC) de palmitato de retinila incorporando bioativos baicaleína (BAI) e benzofenona-3 (BZ3).

| Amostra | Quantidade incorporada / % ($m_{\text{ativo}}/m_{\text{polímero}} * 100$) | Eficiência de Encapsulamento % | Diâmetros das suspensões / nm (PDI) | Potencial Zeta / mV |
|---------|--|-----------------------------------|--|---------------------|
| NCBZ3 | 10 | 99,7 | 210,7 (0,057) | -17,0 ± 1,0 |
| NSBZ3 | 1 | 99,8 | 112,2 (0,045) | -27,5 ± 2,1 |
| NCBAI | 10 | 99,6 | 226,2 (0,143) | -26,7 ± 6,6 |
| NSBAI | 1 | 95,6 | 154,7 (0,041) | -11,1 ± 5,1 |

Tais resultados mostram que o sistema de nanocápsulas é bastante eficiente como sistema reservatório de bioativos. Uma vantagem adicional do



sistema de nanocápsulas em relação ao de nanoesferas (sem o óleo) é a possibilidade de uma maior quantidade de droga incorporada.

Ensaio de permeação em pele humana abdominal

Os experimentos de permeação em membrana biológica foram realizados em pele humana abdominal doada de cirurgia plástica em célula de difusão vertical de Franz. Os tecidos adiposos foram removidos imediatamente após a cirurgia e a pele foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 3 meses antes do uso. A célula de difusão de Franz empregada tem uma área de $2,01\text{ cm}^2$ e capacidade do compartimento receptor de 7 mL. A epiderme foi exposta à célula doadora, enquanto que a derme foi mantida em contato com tampão fosfato (PBS), pH 7,4, contendo 5 % de Tween 80 na célula receptora. Na célula doadora, empregou-se o gel de Carbopol 940 ® a 0,5 % (m/m) com as nanopartículas. O sistema foi mantido sob agitação magnética na célula receptora, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após o período de incubação. A superfície da pele foi cuidadosamente lavada com água destilada e seca com algodão. Realizou-se a quantificação do ativo na camada córnea, removendo-a através da técnica de aplicação de sucessivas fitas adesivas. A extração do ativo foi realizada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 5 mL de metanol, alternando-se entre Vortex e ultrassom por 30 minutos. Realizou-se a extração do ativo do restante da epiderme e da derme pelo mesmo procedimento de extração. As amostras foram filtradas em filtro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e analisadas por HPLC. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 células de Franz para cada formulação.

A Figura 10 apresenta os resultados dos estudos de permeação em célula de difusão vertical de Franz das nanocápsulas incorporadas em gel de Carbopol após 24 h de experimento. As nanocápsulas atingem em alta concentração a epiderme viável e derme, além da solução receptora, indicando que as nanocápsulas apresentam permeação cutânea muito eficiente.

A pele é uma barreira bastante efetiva frente à permeação de diversas substâncias, sendo que a camada córnea (células anucleadas de queratinócitos) apresenta-se como a principal barreira quanto à permeação de ativos (ABURJAI e NATSHET, *Phytother. Res.*, 17, 987-1000, 2003). Uma vez que se atingem camadas mais profundas da epiderme ou derme, o ativo pode



facilmente atingir a corrente sanguínea (nesse caso mimetizado pela célula receptora). Quando a permeação é uniforme e o ativo não-tóxico, a quantidade em que se atinge a corrente sanguínea pode ser desprezível. Além disso, dependendo da ação desejada dos produtos dermatológicos ou cosméticos, faz-se necessário que o ativo atinja as células viáveis da pele (queratinócitos na epiderme e/ou fibroblastos na derme).

A permeação de ativos no sistema de nanocápsulas de palmitato de retinila foi avaliada empregando-se a BZ3 como molécula modelo tanto no sistema de nanoesferas quanto de nanocápsulas, objeto ora apresentado. A Figura 11 apresenta o resultado das análises. Observa-se que as nanocápsulas permitem uma maior permeação do ativo em relação à nanoesferas, o que pode ser devido a uma maior permeação do carreador (devido à flexibilidade das nanocápsulas) conforme os dados observados por TEM. Cabe mencionar que a BZ3 não foi detectada na célula receptora devido à baixa concentração utilizada. No caso do palmitato e retinila (Figura 10), pôde ser detectado na célula receptora por encontrar-se em uma concentração maior na formulação (15 vezes em massa).

Avaliação da permeação em pele humana abdominal por CLSM

Na visualização da profundidade das partículas em pele, os experimentos de permeação foram analisados por microscopia de varredura a laser confocal (CLSM). O experimento consistiu na adição da formulação da suspensão de partículas na célula doadora. Na solução receptora, empregou-se tampão fosfato (PBS) pH 7,4. Manteve-se o sistema sob agitação magnética na solução receptora a 37 °C por 4 h. Após este período as suspensões foram removidas e a pele lavada com PBS pH 7,4 e seca com algodão.

O palmitato de retinila apresenta fluorescência verde quando excitado no UV. Para visualização do polímero PLA, realizou-se uma funcionalização nas terminações de cadeias poliméricas com o corante azul do Nilo. A reação de funcionalização foi realizada através da ativação dos grupos carboxílicos terminais poliméricos com dicicloexilcarbodiimina (DCC), no qual ocorre reação entre os grupos amina do corante e carboxílicos do polímero, tendo-se uma ligação covalente do tipo amida (Pearson e Roush (editors), Handbook of



Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2000). Após purificação do polímero, realizou-se sua caracterização por espectroscopia de fluorescência, observando-se excitação e emissão no vermelho.

5 A Figura 12 mostra a imagem CLSM das nanocápsulas (emissão vermelha e verde, com excitação em 543 nm e 360 nm, respectivamente). O palmitato de retinila (PR) permeia a camada córnea, corroborando com o resultado obtido por HPLC. Cabe destacar que não foi possível observar colocalização do verde e vermelho, sendo que o palmitato de retinila (verde) 10 forma o núcleo das nanocápsulas e o PLA-azul do Nilo (vermelho), a parede polimérica. Nas condições experimentais usadas o palmitato está presente em alta concentração, apresentando o fenômeno de supressão ("quenching"). Sendo assim, pode-se atribuir a marcação em verde principalmente ao palmitato livre (0,1% não-encapsulado). Desta forma, as nanocápsulas são 15 melhores caracterizadas pela permeação do vermelho. Observa-se que parte do palmitato de retinila, possivelmente "livre", permanece na superfície, enquanto que as nanocápsulas (com palmitato de retinila encapsulado e possivelmente livre, proveniente de liberação), permeiam em camadas mais profundas, sendo nesse caso, caracterizadas pelo vermelho da parede 20 polimérica. Isso indica que parte do palmitato livre (talvez por liberação) ou encapsulado permeia juntamente com o polímero, pode-se sugerir que o principal mecanismo de permeação das nanocápsulas é por via intercelular e através de finos poros da pele, pois a permeação apresenta-se bastante uniforme.

25 Os resultados apresentados mostram que este sistema é de grande interesse para se carrear bioativos ou mesmo como forma de armazenamento de vitamina lipossolúvel para liberação sustentada. Sua principal potencialidade, sugerida através dos ensaios realizados, é em aplicação transcutânea em que se deseja ter uma permeação uniforme do carreador. 30 Além disso, essas partículas mostram uma capacidade superior na formação de filmes em comparação a partículas rígidas.

Liberação *in vitro*



Além da possibilidade de associação com outros ativos, investigou-se também uma vantagem adicional das nanocápsulas em relação às nanoemulsões que consiste, supostamente, em uma liberação mais lenta do ativo nas nanocápsulas devido à presença da parede polimérica. O perfil de liberação *in vitro* (através de membrana de diálise de celulose regenerada 3,5 kDa SpectraPor®) em condições de não saturação do ativo no meio é apresentado na Figura 13. As nanocápsulas apresentam o perfil de liberação mais lento enquanto que as nanoesferas apresentam perfil lento no início, mas ao final do período a liberação se acentua aproximadamente 100% do ativo.

10 A liberação mais lenta do ativo nas nanocápsulas em relação às nanoemulsões pode ser devida à presença da parede polimérica. Em relação às nanoesferas, atribui-se às diferenças observadas a diferentes interações ativo-óleo e ativo-polímero.



REIVINDICAÇÕES

1. Nanocápsulas deformáveis **caracterizadas** por compreender uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila.
- 5 2. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pelo fato de que a razão óleo/polímero varia entre 1,0/1,0 e 4,0/1,0 m/m.
3. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizadas** pelo fato de que a razão óleo/polímero varia preferencialmente entre 2,5/1,0 e 3,5/1,0 m/m.
- 10 4. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizadas** pelo fato de que o núcleo oleoso contém um ou mais princípios ativos lipofílicos solúveis.
- 15 5. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizadas** pelo fato de que o dito princípio ativo ser solúvel em pelo menos um reagente selecionado do grupo: solvente orgânico miscível em água, solvente orgânico imiscível em água, surfactante e mistura entre eles.
6. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizadas** pelo fato de que o dito princípio ativo ser solúvel em acetona e polissorbato.
- 20 7. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 2 ou 4, **caracterizadas** por compreender um índice de polidispersão igual ou inferior a 0,2.
- 25 8. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizadas** pelo fato de que o índice de polidispersão varia preferencialmente de 0,07 a 0,19.
9. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizadas** pelo fato de compreender um diâmetro médio de partícula que varia de 182,7 a 285,8 nm.
- 30 10. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizadas** pelo fato de que o valor de elasticidade compreende $31,8 \pm 6,8$.



11. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizadas** por compreender uma faixa de recuperação de palmitato de retinila em relação à quantidade inicial entre 90 e 110 %.

5 12. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizadas** pelo fato de compreender uma eficiência de encapsulamento de 99,6 a 99,9%.

10 13. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com as reivindicações 3, 6, 8 e 12, **caracterizadas** pelo fato de compreender um potencial zeta que varia entre $-32,0 \pm 4,4$ mV e $-7,2 \pm 5,2$ mV.

14. Nanocápsulas deformáveis, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizadas** por compreender uma citotoxicidade de 46% de viabilidade celular a uma concentração de $1140 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 24 horas de incubação.

15 15. Uso de nanocápsulas deformáveis **caracterizadas** por compreender uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo uma razão óleo/polímero que varia preferencialmente entre 2,5/1,0 e 3,5/1,0 m/m, um núcleo oleoso contendo um ou mais princípios ativos lipofílicos aceitáveis em um solvente orgânico e um surfactante, um índice de polidispersão que varia preferencialmente de 0,07 a 0,19, um diâmetro médio de partícula que varia de 182,7 a 285,8 nm, um valor de elasticidade que compreende $31,8 \pm 6,8$, uma faixa de recuperação de palmitato de retinila em relação à quantidade inicial entre 90 e 110 %, uma eficiência de encapsulamento de 99,6 a 99,9% e um potencial zeta que varia entre $-32,0 \pm 4,4$ mV e $-7,2 \pm 5,2$ mV.

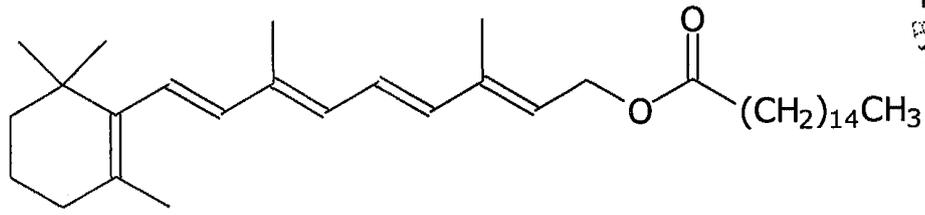
16. Uso de nanocápsulas deformáveis **caracterizadas** por compreender uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo benzofenona na preparação de um cosmético para ser aplicado como protetor solar.



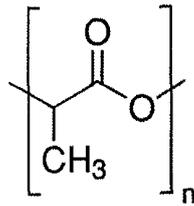
17. Uso de nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizadas** por compreender aplicação dérmica.

5 18. Uso de nanocápsulas deformáveis **caracterizadas** por compreender uma parede polimérica de PLA e um núcleo oleoso de palmitato de retinila contendo um princípio ativo selecionado do grupo dos flavonóides preferencialmente baicaleína na preparação de um medicamento antiinflamatório e antioxidante.

19. Uso de nanocápsulas deformáveis, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizadas** por compreender aplicação dérmica ou parenteral.



PR



PLA

Figura 1

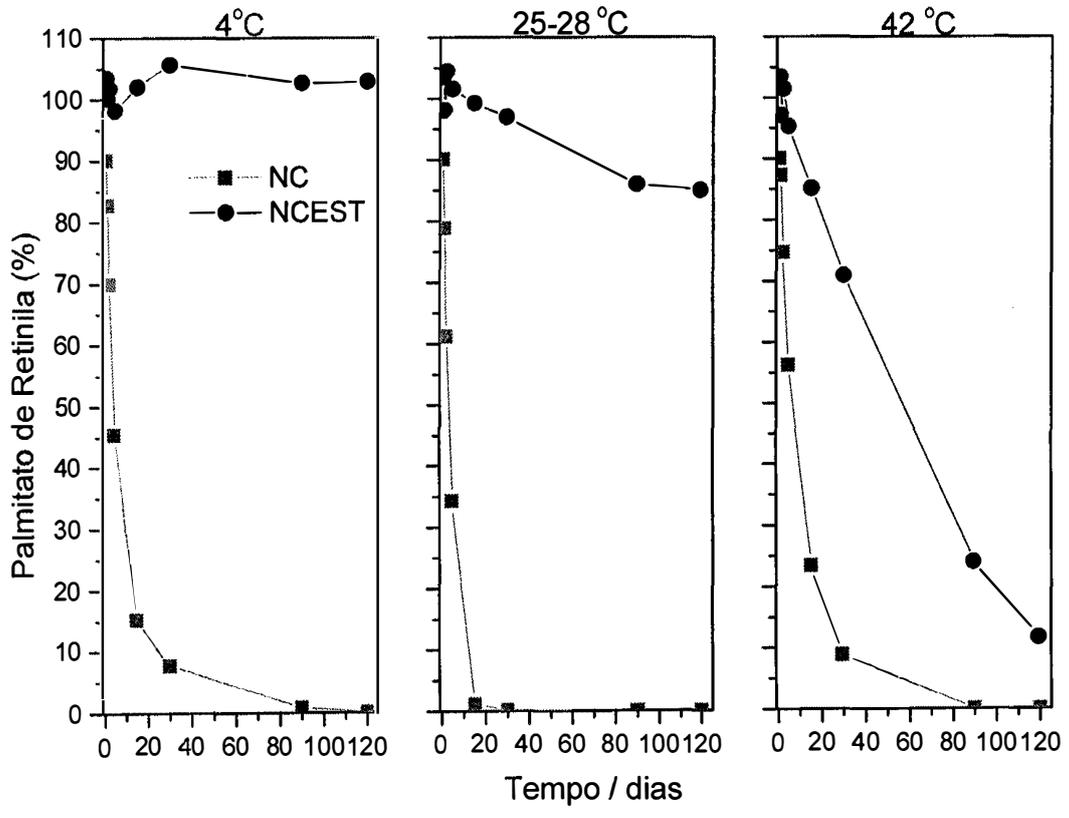


Figura 2

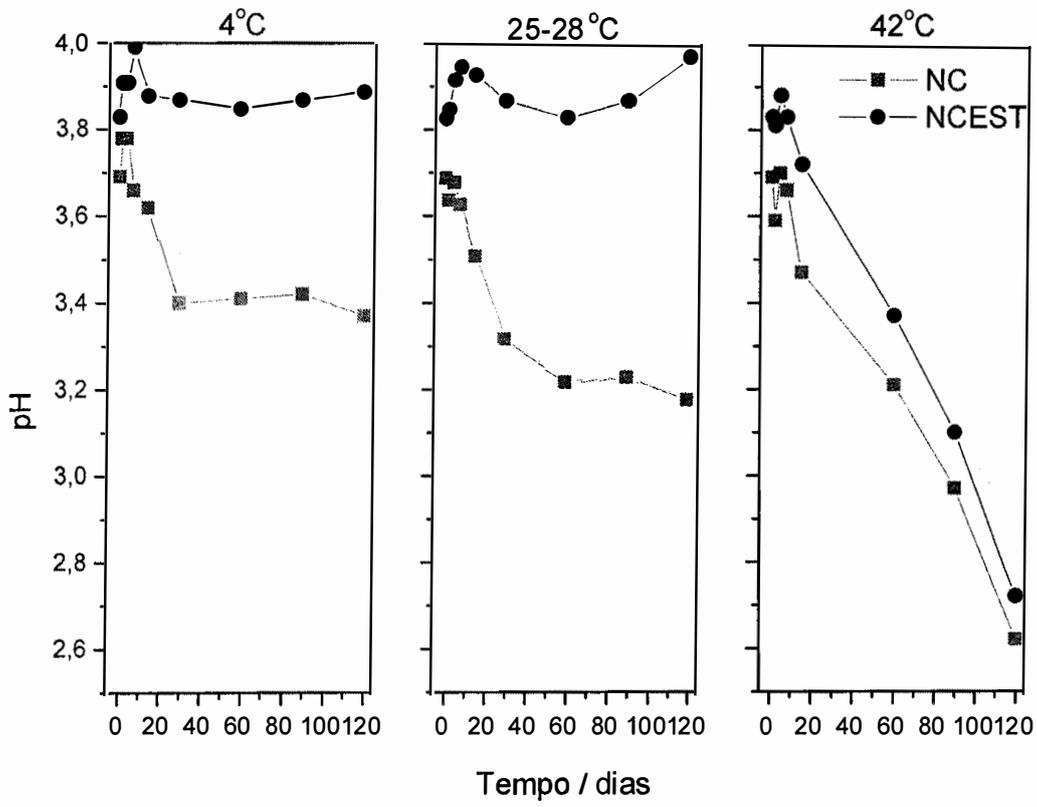


Figura 3

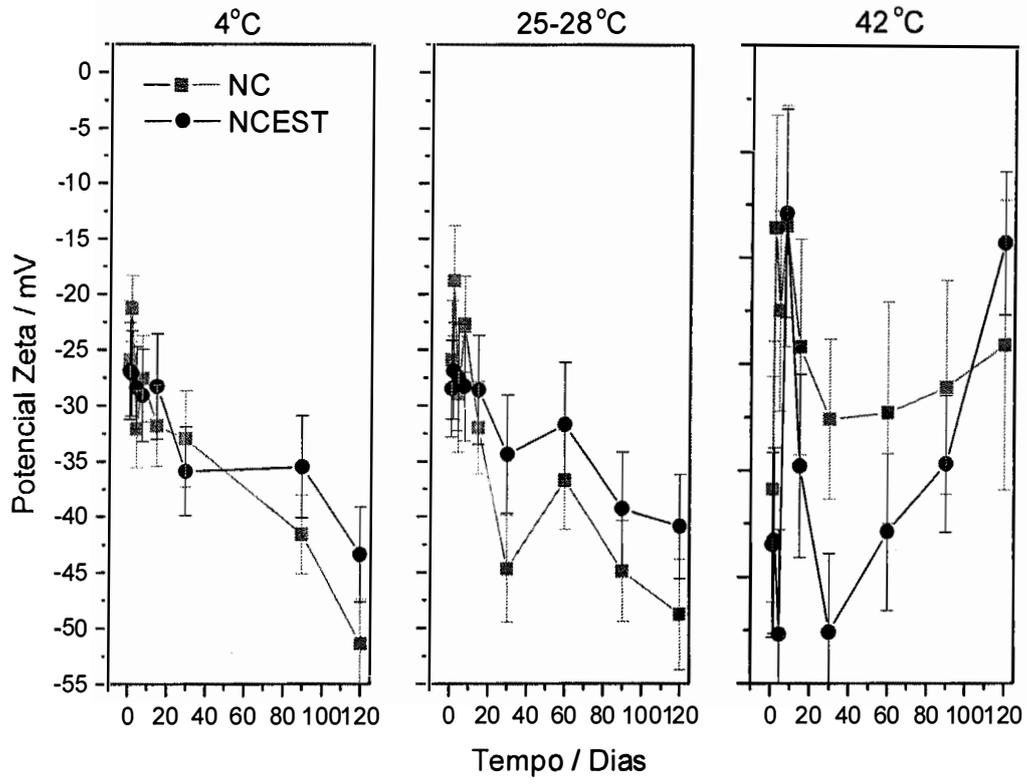


Figura 4

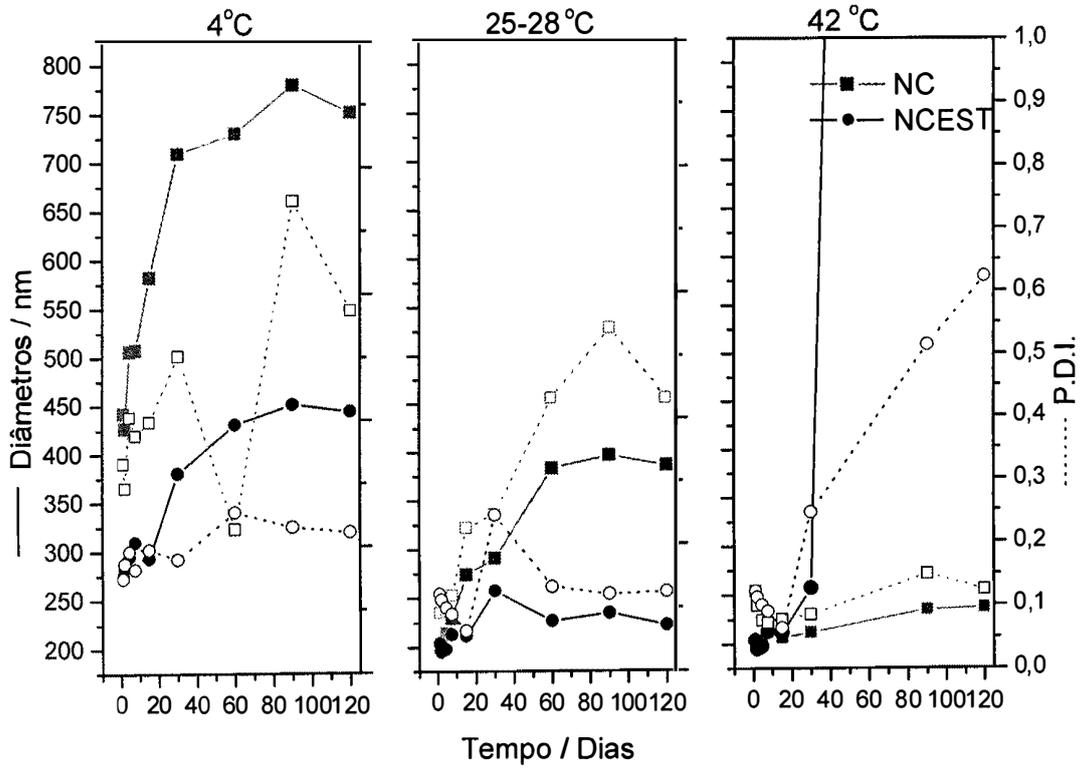
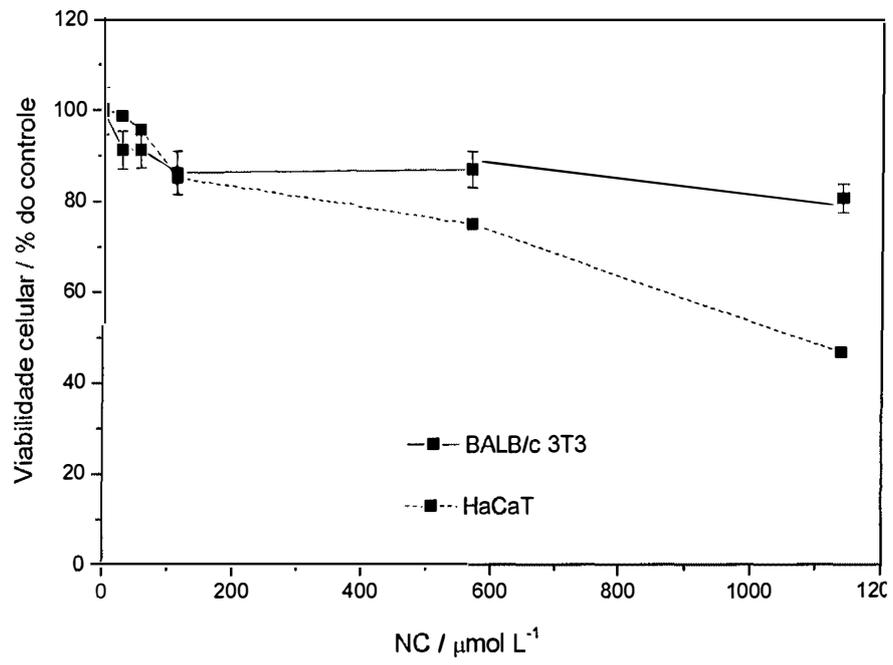
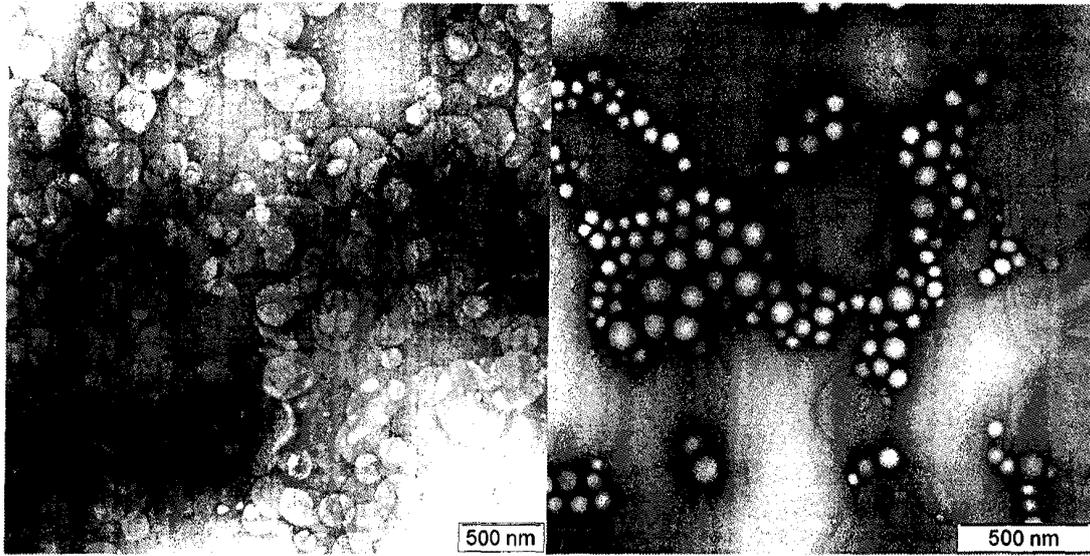


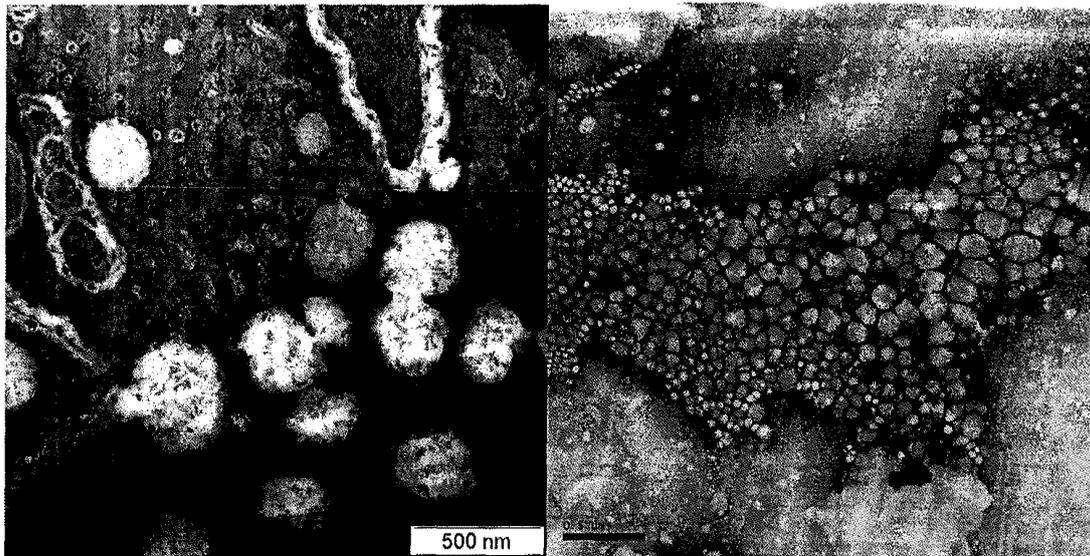
Figura 5

**Figura 6**



A

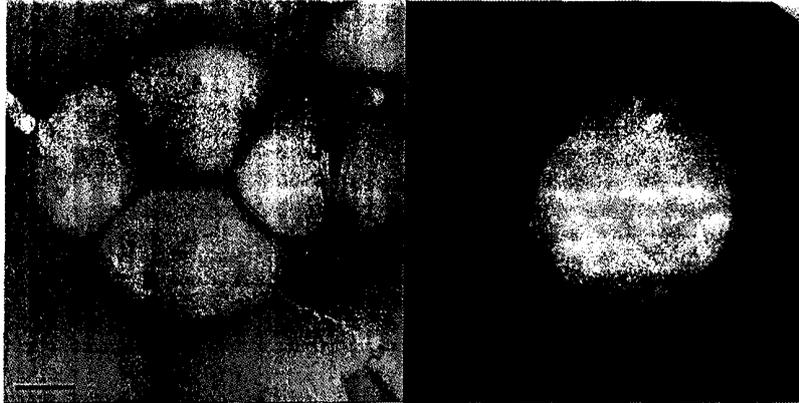
B



C

D

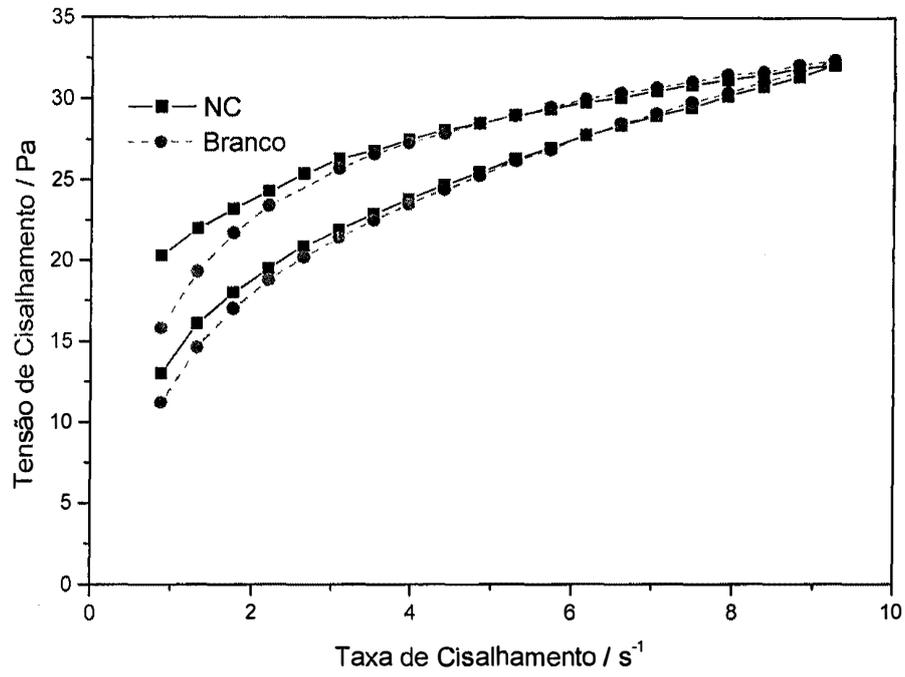
Figura 7



A

B

Figura 8

**Figura 9**

Instituto Nacional de Propriedade Industrial
Fls. 43
Rub: J
BRASIL - 1958

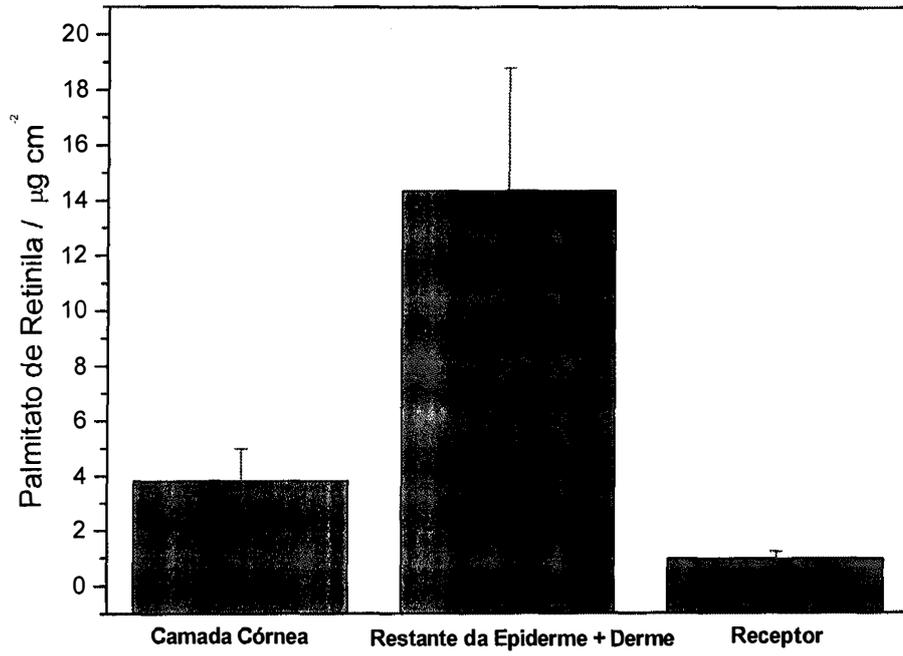


Figura 10

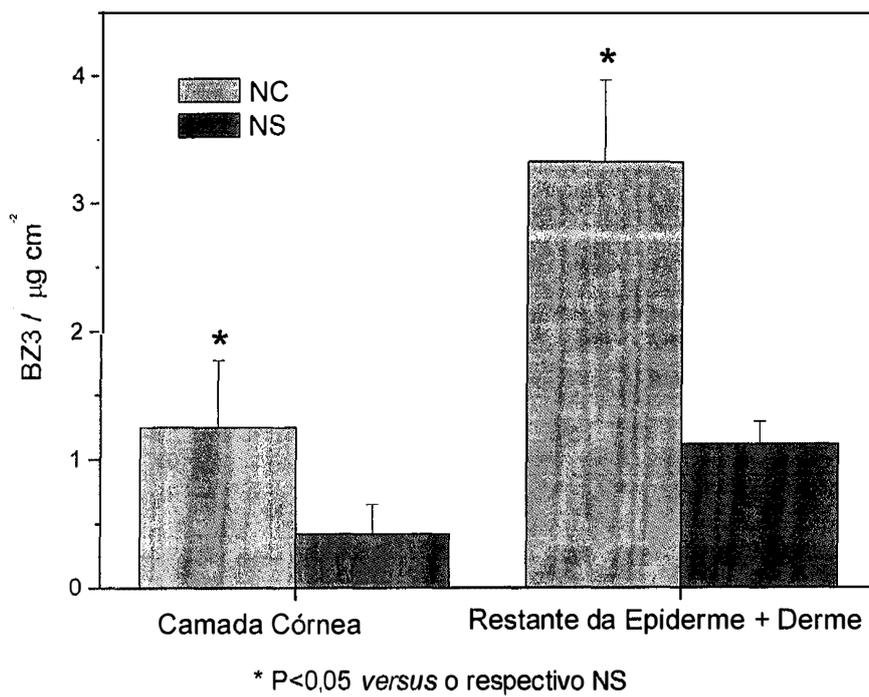
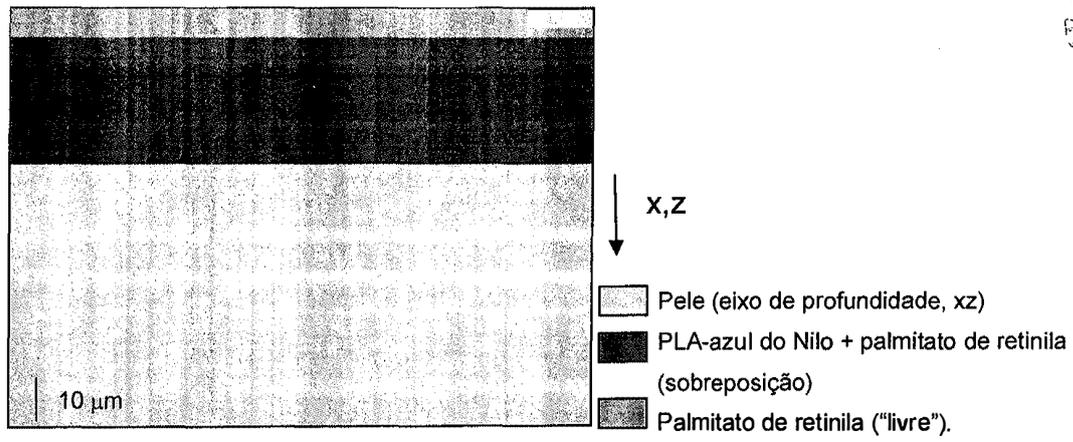


Figura 11

**Figura 12**

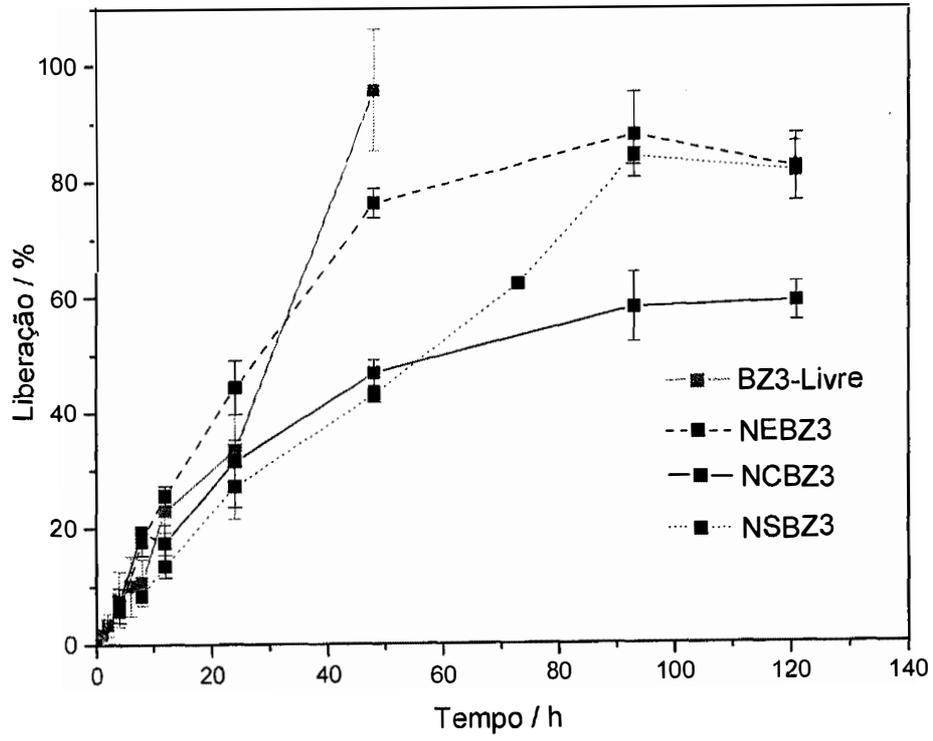


Figura 13

**RESUMO****“NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DEFORMÁVEIS NO
ENCAPSULAMENTO DE BIOATIVOS”**

- 5 A presente invenção refere-se a uma nanocápsula deformável compreendendo uma parede polimérica de poli (D,L-lactídeo) (PLA) e um núcleo oleoso de palmitato de retinila que compreende um ou mais princípios ativos lipofílicos solúveis com característica de deformação, baixo índice de polidispersão, maior diâmetro comparadas com nanoesferas, alto índice de eficiência de encapsulamento, estáveis, elásticas e de baixa citotoxicidade.
- 10 Dessa forma, o objeto da presente invenção pode ser de grande interesse para sistemas de liberação sustentada de fármacos ou ativos cosméticos por indústrias farmacêuticas e cosméticas.