



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

(21) **PI0709594-5 A2**

(22) Data de Depósito: 12/03/2007
(43) Data da Publicação: 19/07/2011
(RPI 2115)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 9/51 2006.01
A61K 8/11 2006.01
B01J 13/02 2006.01

(54) Título: **SISTEMA QUE COMPREENDE NANOCÁPSULAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E COSMÉTICA CONTENDO O SISTEMA E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO**

(30) Prioridade Unionista: 13/03/2006 EP 06380048.6

(73) Titular(es): Advanced In Vitro Cell Technologies, S.L

(72) Inventor(es): Ana Isabel Vila Pena, Maria José Alonso Fernández, Sílvia Suárez Luque

(74) Procurador(es): Vieira de Mello Advogados

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007052276 de 12/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/104732 de 20/09/2007

(57) Resumo: SISTEMA QUE COMPREENDE NANOCAPSULAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICA E COSMÉTICA CONTENDO O SISTEMA E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO. A invenção se refere a sistemas de nanocápsulas caracterizados porque têm alta estabilidade durante longos períodos de tempo. Estes sistemas são úteis para a liberação controlada de ingredientes cosmeticamente ou farmacologicamente ativos de natureza altamente lipofílica. O sistema compreende nanocápsulas com um tamanho médio inferior a 1 μm dispersas em um meio aquoso, em que as nanocápsulas têm uma estrutura compreendendo uma fase lipofílica contendo um componente fosfolipídico e um ou mais ácidos graxos de cadeia $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$ saturada e/ou insaturada ou derivados dos mesmos; e uma fase hidrofílica que compreende quitosana ou um derivado da mesma e um composto polioxialquilado.



SISTEMA QUE COMPREENDE NANOCÁPSULAS, COMPOSIÇÕES
FARMACÊUTICA E COSMÉTICA CONTENDO O SISTEMA E PROCESSO PARA
A PREPARAÇÃO DO MESMO

DESCRIÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção se refere a sistemas nanoencapsulados caracterizados porque têm alta estabilidade durante longos períodos de tempo. Estes sistemas são úteis para a liberação controlada de moléculas cosmeticamente ou farmacologicamente ativas, especialmente de natureza altamente lipofílica. Refere-se especificamente a sistemas que compreendem nanocápsulas dispersas em uma fase aquosa, composições cosméticas e farmacêuticas que os compreendem, assim como a processos para sua preparação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os sistemas para a liberação de agentes biologicamente ativos formam um campo de pesquisas em constante desenvolvimento. É amplamente conhecido no campo da medicina galênica que a administração de ingredientes ativos, especialmente aqueles de natureza altamente lipofílica, por via tópica (transdérmica ou pela mucosa) é particularmente inadequada, devido ao fato que sua alta lipofilicidade torna praticamente impossível sua penetração através da barreira lipídica epidérmica.

Por esta razão, nas últimas duas décadas, diferentes sistemas têm sido desenvolvidos para a liberação deste tipo de moléculas que permitem aumentar a biodisponibilidade e a absorção destes fármacos por via epitelial depois de sua aplicação. Dentre estes sistemas, é de particular interesse

a preparação de suspensões coloidais tais como lipossomas, microemulsões, nanosferas e nanopartículas, constituídas por uma fase oleosa em que o ingrediente ativo é incorporado, disperso em uma fase aquosa em que um ou
5 vários agentes tensoativos são incorporados.

Assim, Calvo et al. [*J. Pharm. Pharmacol.*, 1996, 48, 1147-52] revelam sistemas coloidais para a liberação de indometacina por via ocular, consistindo de uma fase oleosa de lecitina e poli- ϵ -caprolactona dispersa em uma fase
10 aquosa que contém poloxâmero como um agente tensoativo.

Por sua parte, o pedido EP 760 237 se refere a microemulsões para a liberação de substâncias insolúveis em água, tais como ciclosporina, que contém uma fase dispersa lipofílica, consistindo de triglicerídios, lecitina e um
15 tensoativo, e uma fase hidrofílica aquosa que contém propilenoglicol.

O pedido W097/22358 revela microemulsões em que a ciclosporina está dissolvida em um sistema que compreende uma fase hidrofóbica, consistindo de tocoferol ou derivados
20 do mesmo, e uma série de componentes hidrofílicos tais como carbonato de propileno e polietilenoglicol, assim como um tensoativo.

No entanto, o principal inconveniente destes tipos de sistemas coloidais é que eles têm uma carga líquida negativa, de modo que seu contato com certos componentes
25 biológicos de caráter catiônico (alguma proteína, íons de sódio e potássio) causa a neutralização da carga superficial, o rompimento do sistema e, conseqüentemente, a perda do ingrediente ativo. Por outro lado, estes sistemas

carregados negativamente também podem sofrer uma repulsão eletrostática por parte das membranas biológicas uma vez que ditas membranas também têm uma carga negativa.

A fim de superar esta limitação, tem sido realizado um importante trabalho de pesquisa com o propósito de desenvolver sistemas coloidais que tenham uma carga líquida positiva e que, portanto, permita que eles sejam absorvidos em ambientes biológicos de caráter catiônico e/ou sua adesão a membranas biológicas, tais como mucosa e pele.

O pedido W096/37232 se refere a sistemas baseados em nanoemulsões, nanocápsulas e nanopartículas consistindo de um núcleo lipofílico e revestidos com quitosana para a administração de ingredientes ativos por vias diferentes. A incorporação do polímero de quitosana hidrofílico na fase aquosa confere a carga líquida positiva ao dito sistema. Desde então, têm sido desenvolvido sistemas que incorporam este polímero ou outros que permitem que se proporcione a carga positiva desejada.

Assim, Calvo et al. [*Colloid. Polim. Sci.*, 1997, 275, 46-53] revelam os mesmos sistemas coloidais do pedido mencionado no parágrafo anterior, mas adicionalmente incorporando poloxâmero como agente tensoativo na fase aquosa, para liberar moléculas lipofílicas usando diazepam como modelo. Na mesma linha, a publicação científica de El-Shabouri [*Intern. J. Pharmac.*, 2002, 249, 101-8] descreve um sistema coloidal, em que, além da quitosana, o uso de glicolato de sódio ou gelatina-A na fase aquosa e sua capacidade para liberação de ciclosporina, são analisados.

Do mesmo modo, o artigo de Filipovic-Grcic [J. Microencap., 2001, 18(1), 3-12] se refere a sistemas mucoadesivos baseados em um núcleo lipossômico revestido com quitosana em que um marcador de alto peso molecular é incorporado (fluoresceína isotiocianato-dextrana), analisando a estabilidade de dito sistema em um fluido gástrico simulado como uma função da proporção de quitosana e seu peso molecular.

No entanto, um problema técnico importante associado ao uso deste tipo de sistemas no campo da medicina e cosmetologia, está relacionado a uma instabilidade, tanto durante a armazenagem como depois de sua administração *in vivo*. Especificamente, a composição destes sistemas provoca, durante armazenagem por períodos de tempo mais longos que um mês e a temperaturas superiores à temperatura ambiente, que o ingrediente ativo seja gradualmente liberado da fase lipofílica e se mova para a fase aquosa em que o mesmo é insolúvel, levando a sua precipitação e a formação de cristais.

Em vista destes dados, o desenvolvimento de sistemas de nanocápsulas estáveis é especialmente necessário, particularmente para a liberação de ingredientes ativos lipofílicos e que têm, além de uma grande capacidade para uma associação de estas moléculas e sua liberação no ambiente biológico apropriado, uma estabilidade que é claramente melhorada durante sua armazenagem e transporte, características essenciais do ponto de vista da aplicabilidade industrial.

Outro problema técnico é que a maioria destes sistemas é instável quando se submetem a processos de esterilização, tais como autoclavagem ou pasteurização. Estes processos envolvem submeter os sistemas a temperaturas superiores a 100°C por curtos períodos de tempo. Em geral, estas condições físicas fortes mudam drasticamente a solubilidade dos diferentes componentes e levam ao rompimento de emulsões ou partículas, com a formação de uma fase oleosa onde o ingrediente ativo poderia ser encontrado. Portanto seria altamente desejável encontrar um sistema para a liberação controlada de ingredientes ativos ou ingredientes cosméticos com caráter lipofílico, que podem ser administrados topicamente e que sejam estáveis inclusive quando são submetidos a processos de esterilização.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Os inventores encontraram que um sistema de nanocápsulas que compreendem um núcleo lipofílico que compreende um componente fosfolipídico e um óleo compreendendo ácidos graxos de cadeia C₁₂-C₂₄ saturada e/ou insaturada ou derivados dos mesmos, e uma fase hidrofílica que compreende quitosana e um composto polioxialquilenado, tem uma alta estabilidade em suspensão aquosa por períodos de tempo de mais de dois anos em condições de armazenagem normais, o que representa um aspecto chave da exeqüibilidade comercial e industrial destes sistemas. Adicionalmente permite uma associação eficiente e liberação subsequente de moléculas altamente lipofílicas.

Uma vantagem adicional derivada destes sistemas é sua capacidade de submeter-se a processo de esterilização a

altas temperaturas enquanto mantém suas estrutura e propriedades, tais como tamanho de partícula e potencial Z. Este aspecto é particularmente relevante quando seu uso é requerido, por exemplo, em aplicações oculares em que a esterilização é compulsória. Além disso, a possibilidade de esterilizar estes sistemas permite a redução, e em alguns casos, a eliminação da necessidade do uso de conservantes nas formulações finais.

Portanto, um objeto da presente invenção consiste de um sistema que compreende nanocápsulas com um tamanho médio inferior a 1 μm dispersas em um meio aquoso, em que as nanocápsulas têm uma estrutura compreendendo

a) uma fase lipofílica compreendendo:

a.1) pelo menos um componente fosfolipídico; e

a.2) um óleo que compreende um ou mais ácidos graxos de cadeia $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$ saturada e/ou insaturada ou derivados dos mesmos;

b) uma fase hidrofílica compreendendo:

b.1) quitosana ou um derivado da mesma; e

b.2) um composto polioxialquilenado.

Em uma modalidade particular da invenção, o sistema de nanocápsulas adicionalmente compreende uma molécula lipofílica ativa na fase lipofílica da nanocápsula, capaz de prevenir, aliviar ou curar doenças. Em uma modalidade preferida, a molécula lipofílica ativa é ciclosporina.

Em uma outra modalidade particular, o sistema de nanocápsulas adicionalmente compreende uma molécula biologicamente ativa de caráter hidrofílico adsorvida na superfície da nanocápsula, selecionada de peptídeos,

proteínas, hormônios, antígenos/alérgenos, anticorpos, heparina, DNA, RNA e oligonucleotídeos.

Um segundo objeto da invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo o sistema definido previamente.

Outro objeto da invenção se refere a uma composição cosmética compreendendo o sistema definido previamente. Em uma modalidade particular da invenção, dita composição cosmética pode adicionalmente incorporar uma molécula cosmeticamente ativa.

Um objeto final da invenção se refere a um processo para a preparação do sistema definido anteriormente compreendendo:

- a) preparação da fase lipofílica pela dissolução do componente fosfolipídico e o óleo em um solvente orgânico, e opcionalmente uma molécula lipofílica como ingrediente ativo;
- b) preparação da fase hidrofílica pela dissolução em água da quitosana e do composto polioxialquilenado;
- c) aquecimento de ambas as fases até uma temperatura entre 40 e 60°C;
- d) mistura da fase lipofílica e hidrofílica com formação espontânea das nanocápsulas;
- e) eliminação do solvente orgânico.

Os sistemas e composições da invenção são especialmente adequados para a administração de moléculas biologicamente ativas com um caráter lipofílico que são incorporadas na fase lipofílica das nanocápsulas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O sistema da presente invenção compreende nanocápsulas que estão dispersas em um meio aquoso, em que ditas nanocápsulas têm uma estrutura compreendendo uma fase lipofílica, em que um ingrediente ativo pode ser incorporado, e uma fase hidrofílica.

O termo "nanocápsula" é entendido como um núcleo de natureza lipofílica cercado por uma fase hidrofílica que compreende uma quitosana com carga positiva que "encapsula" o núcleo. A nanocápsula está dispersa em um meio aquoso, em que dito meio aquoso pode compreender quantidades adicionais de quitosana e/ou de outros polímeros hidrofílicos em dissolução. A interação iônica resultante entre os diferentes componentes lipofílicos e hidrofílicos da nanocápsula gera entidades físicas características, que são independentes e observáveis, cujo tamanho médio é inferior a 1 μm , isto é, um tamanho médio entre 1 e 999 nm.

"Tamanho médio" é entendido como o diâmetro médio da população de nanocápsulas, que compreende a fase lipofílica e a fase hidrofílica, que se movem juntos no meio aquoso. O tamanho médio destes sistemas pode ser medido usando procedimentos padrão conhecidos por um técnico no assunto, e que estão descritos, por exemplo, na parte experimental a seguir.

As nanocápsulas do sistema da invenção são caracterizadas porque têm um tamanho de partícula médio inferior a 1 μm , preferivelmente têm um tamanho médio entre 1 e 999 nm, preferivelmente entre 50 e 800 nm. O tamanho médio das cápsulas é principalmente influenciado pela quantidade do componente fosfolipídico (em quantidades

maiores, o tamanho resultante é menor), pela quantidade e peso molecular da quitosana (o tamanho aumenta com uma maior quantidade ou peso molecular), a densidade do óleo usado, e pelos parâmetros do processo de preparação, tais como a velocidade de agitação e a temperatura de ambas as fases no processo de mistura.

Além disso, as nanocápsulas podem ter uma carga superficial (medida pelo potencial Z) atribuída aos grupos amina da quitosana, cuja magnitude pode variar entre +1 mV e +70 mV.

Fase lipofílica

A fase lipofílica que está presente na nanocápsula compreende pelo menos um componente fosfolipídico e um óleo consistindo de um ou vários ácidos graxos (C_{12} - C_{24}) de cadeia longa saturada e/ou insaturada, ou derivados dos mesmos. Sua função é alojar o ingrediente ativo lipofílico quando este está presente, tanto se é ativo no sentido farmacológico como cosmético, o qual será liberado mais tarde em um ambiente biológico adequado.

Componente fosfolipídico

Na presente descrição o componente fosfolipídico é entendido como sendo um tipo de lipídio iônico, que em sua forma mais simples está compreendido de um glicerol, ao qual dois ácidos graxos (1,2-diacilglicerol) e um grupo fosfato estão ligados. Usualmente, o grupo fosfato é ligado por uma ligação fosfodiéster a outro grupo de átomos, que freqüentemente contém nitrogênio, tais como colina, serina ou etanolamina e muitas vezes têm uma carga elétrica. Outros fosfolipídios são derivados de aminoálcool

esfingosina ou dihidroesfingosina (esfingolipídios), e não necessariamente de glicerol. O composto resultante tem uma parte lipofílica para as cadeias dos ácidos graxos e uma parte hidrofílica para o grupo fosfato e a carga elétrica.

5 No sistema da invenção o componente fosfolipídico é preferivelmente selecionado de fosfoglicerídios, esfingolipídios, cefalina e misturas dos mesmos. Os fosfoglicerídios, tais como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina e ácido fosfatídico, são lipídios formados por ácidos graxos, glicerina, ácido fosfórico e álcool (por exemplo, colina, serina, etanolamina, glicerina ou inositol). Esfingolipídios tais como esfingomielinas são
10 formados por esfingosina, um ácido graxo, ácido fosfórico e um álcool ou aminoálcool. A cefalina é formada de glicerina, ácido fosfórico, dois ácidos graxos e duas bases alcoólicas (colina e esfingosina).
15

Em uma modalidade preferida da invenção, o componente
20 fosfolipídico compreende fosfoglicerídios. Mais preferivelmente compreende fosfoglicerídios selecionados de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina e ácido fosfatídico ou misturas dos mesmos.

25 Em outra modalidade preferida, o componente fosfolipídico é lecitina. Preferivelmente é usada lecitina de soja disponível comercialmente, apesar de lecitina de ovo também poder ser usada.

A lecitina é uma mistura complexa de compostos lipídicos, em que a maioria deles são compostos fosfolipídicos, especificamente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolina. Em geral, as lecitinas são denominadas por seu nome comercial e um número que indica a percentagem de fosfatidilcolina em sua composição. A percentagem de fosfatidilcolina nas lecitinas pode variar entre 35% até praticamente 100%, no entanto na presente invenção as lecitinas são preferivelmente usadas quando sua percentagem está entre 35% e 75%, preferivelmente entre 35% e 55%. O uso de lecitinas com uma porcentagem muito alta (superior a 80%) não é aconselhável dado que proporciona o aumento de presença de óleo livre na suspensão de nanocápsulas. Com este respeito, existem várias lecitinas disponíveis no mercado que têm a característica de uma percentagem de fosfatidilcolina de não mais de 80%. Portanto, são usadas preferivelmente Epikuron 135F, Epikuron 145V, Epikuron 170, Lipoid S30, Lipoid S45 e Lipoid S75.

Do mesmo modo, a razão fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina influencia a formação de nanocápsulas com propriedades de estabilidade adequadas. Portanto, foi demonstrado que o uso de Epikuron 135F, em que a razão fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina é aproximadamente 7/1 e a proporção de fosfatidilcolina é superior a 35% na composição, proporciona os melhores resultados de estabilidade.

Óleo

O óleo compreendido na fase lipofílica consiste de um ou vários ácidos graxos de cadeia C_{12} - C_{24} insaturados e/ou saturados ou derivados dos mesmos. Exemplos de ditos ácidos graxos incluem, a pesar de não se limitar a, ácidos graxos saturados tais como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido acacídico, ácido carnacílico, ácido araquídico, ácido behênico, ácido lignocérico ou ácido cerótico; ácidos graxos monoinsaturados tais como ácido laurooléico, ácido palmitoléico, ácido oléico, ácido vaccênico, ácido gadoléico, ácido cetoléico, ou ácido erúcico; ácidos graxos poliinsaturados tais como ácido linoléico, ácido linolênico, ácido gamalinolênico, ácido estearidônico, ácido araquidônico, ácido clupanodônico ou ácido docosaheptaenóico.

Do mesmo modo, derivados destes ácidos graxos podem ser usados, entendendo por esta definição aqueles compostos com um caráter altamente lipofílico e produzidos como consequência da reação do grupo ácido com álcoois ou aminas, tais como, por exemplo, os ésteres ou amidas de ditos ácidos graxos. Da mesma maneira, a definição de derivados de ácido graxo inclui aqueles ácidos graxos, seus ésteres ou suas amidas que têm hidroxila, grupos éter ou grupos alquila como substituintes de sua cadeia de hidrocarboneto, tais como, por exemplo, ácido cerebrônico, ácido hidroxinervônico, ácido ricinoléico, ácido tuberculosteárico ou ácido fitânico; ou aqueles ácidos graxos que têm a estrutura cíclica na cadeia de

hidrocarboneto, tais como ácido lactobacílico ou ácido chaulmógrico.

Em termos gerais, quaisquer óleos vegetais podem ser usados, tais como, por exemplo, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de soja, óleo de algodão, óleo de amendoim, óleo de onagra, óleo de borragem, óleo de oliva, óleo de coco, óleo de palma, óleo de semente de cânhamo, óleo de miolo ou semente de abricó, óleo de gérmen de trigo, óleo de gérmen de milho, óleo de manteiga de cacau, óleo de macadâmia, óleo de amêndoa, óleo de abacate, óleo de calêndula, óleo de semente de uva, óleo de gergelim, óleo de jojoba, óleo de avelã, etc.

Surpreendentemente, foi descoberto que a incorporação deste tipo de óleo na composição das nanocápsulas é particularmente relevante para dar ao sistema alta estabilidade durante longos períodos de tempo se o mesmo for comparado com outros óleos usados no estado da técnica, tais como os óleos comercialmente chamados Migliol ou Labrafac. Em particular, tem sido observado usando ensaios simulados em condições aceleradas que o sistema da invenção é estável durante 5-6 meses, a temperaturas de cerca de 37°C, o que é equivalente a quase dois anos em condições de armazenagem normais à temperatura ambiente. Quando isto é comparado com os resultados de outros tipos de óleos tais como Migliol 840 e Labrafac Lipophile (consistindo de uma mistura de diésteres ou triglicerídios de ácidos graxos de cadeia C₈-C₁₀ saturada) tem sido visto que a estabilidade do sistema aumenta até 6 vezes.

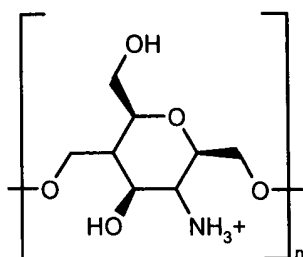
Em uma modalidade preferida da invenção, o óleo compreendido na fase lipofílica é óleo de rícino. Dito óleo é obtido por prensagem a frio de sementes de *Ricinus Communis* L., no entanto, é um produto disponível comercialmente. Tem uma composição de ácidos graxos (C₁₆-C₁₈) de cadeia longa: 2% (máximo) de ácido palmítico, 2,5% (máximo) de ácido esteárico, 2,5-6,0% de ácido oléico, 2,5-7,0% de ácido linoléico 1% (máximo) de ácido linolênico e 85-92% de ácido ricinoléico.

Fase hidrofílica

A fase hidrofílica compreende quitosana ou um derivado da mesma e um composto polioxiálquilenado que atua como agente tensoativo, além de água. A função desta fase é provavelmente recobrir a nanocápsula, além de provê-la com uma carga positiva que permite a mesma ser absorvida através de ambientes biológicos de caráter catiônico ou absorção sobre os mesmos.

Quitosana

A quitosana é um polímero de origem natural derivado da quitina (poli-N-acetil-D-glucosamina), em que uma parte importante dos grupos acetil do N foram eliminados por hidrólise. O grau de desacetilação é preferivelmente superior a 40%, mais preferivelmente superior a 60%. Em uma variante está entre 60-98%. Portanto, tem uma estrutura de aminopolissacarídeo e caráter catiônico. Compreende a repetição das unidades monoméricas de fórmula (I):



(I)

em que n é um número inteiro, e, além disso, unidades
5 m em que o grupo amina é acetilado. A soma de $n + m$
representa o grau de polimerização, isto é, o número de
unidades monoméricas na cadeia de quitosana.

A quitosana usada para produzir as nanocápsulas da
presente invenção tem um peso molecular entre 2 e 2000 kDa,
10 preferivelmente entre 2 e 500 kDa, mais preferivelmente
entre 5 e 150 kDa. Exemplos de quitosanas comerciais que
podem ser usadas são UPG 113, UP CL 213 e UP CL113 que
podem ser obtidas de NovaMatrix, Drammen, Noruega.

Como uma alternativa a quitosana, um derivado da mesma
15 também pode ser usado, entendendo como tal uma quitosana em
que um ou mais grupos hidroxila e/ou um ou mais grupos
amina foram modificados, com o objetivo de aumentar a
solubilidade da quitosana ou aumentar a natureza adesiva da
mesma. Estes derivados incluem, entre outros, quitosanas
20 acetiladas, alquiladas ou sulfonadas, derivados tiolados,
tal como é descrito em Roberts, *Chitin Chemistry*,
Macmillan, 1992, 166. Preferivelmente, quando um derivado é
usado é selecionado de éteres O-alkil, ésteres O-acil,
trimetilquitosana, quitosanas modificadas com
25 polietilenoglicol, etc. Outros derivados possíveis são
sais, tais como citrato, nitrato, lactato, fosfato,
glutamato, etc. Em qualquer caso, um técnico no assunto
sabe como identificar as modificações que podem ser feitas

na quitosana sem afetar a estabilidade e a exequibilidade comercial da formulação final.

Composto polioxialquilenado

Por esta parte, composto polioxialquilenado é entendido como o significado de um polímero hidrofílico sintético de caráter não iônico que tem unidades de óxido de alquilenos em sua estrutura, sendo preferido o uso de um polioxietileno (PEO) ou um copolímero óxido de etileno-óxido de propileno (PEO-PPO - *ethylene oxide-propylene oxide*). Neste último caso, quando um copolímero de PEO e PPO é usado, a proporção de PEO no copolímero pode variar dentre 10% e 80% em peso, o resto (até 100%) sendo PPO.

Estes polímeros são comercializados com diferentes pesos moleculares, no entanto, na presente invenção o uso de derivados polioxietilenados que têm pesos moleculares entre 1000 e 25000 é preferido. Em uma modalidade preferida, o derivado polioxietilenado é um copolímero de três blocos (PEO-PPO-PEO), tais como, por exemplo, aqueles denominados comercialmente Poloxâmero. Têm sido obtidos bons resultados, por exemplo, com Pluronic F68 (Poloxâmero 188).

O composto polioxialquilenado é usado como agente tensoativo no sistema e sua presença é particularmente necessária para conferir estabilidade ao mesmo, dado que de outra maneira, as nanocápsulas se agregam durante a armazenagem. Portanto, em sua ausência, um aumento no tamanho de partícula tem sido observado depois de duas semanas a 37°C. Além disso, foi possível demonstrar que a incorporação deste composto quase não afeta o tamanho das

nanocápsulas formadas, tal como pode ser observado na tabela I.

Tabela I: Influência da quantidade de poloxâmero na estabilidade da nanocápsula

poloxâmero (mg)	Tamanho inicial	Tamanho depois de 2 semanas a 37°C
0	492	754
125	482	475
205	439	442
500	410	423

Em uma variante da invenção, o sistema tem uma proporção de componente fosfolipídico que está preferivelmente entre 0,1% e 10% em peso com respeito ao peso total do sistema incluindo a água, preferivelmente entre 0,5% e 5%, mais preferivelmente entre 1% e 2,5% em peso. Proporções inferiores a 0,1% do componente fosfolipídico poderiam não ser recomendáveis uma vez que poderia levar a presença de óleo livre na suspensão de nanocápsulas; por outro lado, uma proporção superior a 10% poderia levar a formação de partículas e não sistemas encapsulados devido à interação da quitosana com componente lipídico de carga positiva com carga negativa.

Por outro lado, em outra variante da invenção a proporção de óleo no sistema varia desde 1%-20%, preferivelmente desde 2,5% e 10%, em peso com respeito ao peso total do sistema incluindo a água. Quantidades menores

envolvem a redução de ingrediente ativo que pode ser encapsulado, enquanto que quantidades maiores tornam necessário aumentar a proporção de outros componentes, tais como o componente fosfolipídico, para evitar a presença de óleo livre no sistema.

Em outra variante da invenção a proporção de quitosana, ou de um derivado da mesma, é preferivelmente entre 0,05% e 10% em peso com respeito ao peso total do sistema incluindo a água, preferivelmente entre 0,1% e 2%, e mais preferivelmente entre 0,25% e 1%. Proporções maiores que as mencionadas causam um aumento em viscosidade da suspensão, o que pode ser vantajoso para algumas aplicações, mas dificultam consideravelmente a fase de eliminação do solvente e concentração da fórmula.

Por sua parte, a proporção de composto polioxialquilenado é preferivelmente entre 0,05% e 10% em peso, preferivelmente entre 0,1% e 5% em peso, mais preferivelmente entre 1% e 2,5%.

Em todos os casos, a proporção restante corresponde em boa parte à água purificada onde as nanocápsulas estão dispersas. Isto não significa que outros ingredientes não possam estar presentes, ou nas nanocápsulas (um ou mais ingredientes ativos lipofílicos, ingredientes cosméticos, etc), no meio aquoso onde estão dispersas (agentes de viscosidade, conservantes, fragrâncias, etc) ou absorvidos sobre as mesmas (ingredientes ativos hidrofílicos, ácido hialurônico, etc).

Em uma variante do sistema da invenção, as nanocápsulas estão dispersas em um meio aquoso que

adicionalmente compreende um polímero hidrofílico, cuja função é dar propriedades de viscosidade ao sistema, aumentando em boa parte a densidade da mesma. A adição deste componente é devido ao sistema de nanocápsulas dispersas em meio aquoso da invenção resultando em alguns casos fluido demais do ponto de vista da sua aplicação, especialmente quando se deseja fabricar composições cosméticas ou farmacêuticas semi-sólidas tais como géis, cremes, pomadas ou bálsamos. Entre os polímeros hidrofílicos com caráter de viscosidade os seguintes podem ser usados, entre outros, carboidratos e derivados, ácidos carboxílicos, poliglicóis tais como poli(álcool vinílico), derivados de polivinilpirrolidona, quitosana ou um derivado da mesma, poloxâmeros, polietilenoglicol, ácido hialurônico ou misturas dos mesmos.

Outra variante da invenção incorpora, depois da formação das nanocápsulas, ácido hialurônico ou seus sais no meio aquoso, devido a suas diferentes propriedades e funções. Por um lado, é absorvido sobre as nanocápsulas variando algumas de suas propriedades tais como a carga. Por outro lado, tem sido visto que estimula a interação com membranas celulares e mucina (proteína presente na mucosa). Adicionalmente, dependendo da quantidade usada, pode permanecer dissolvido no meio aquoso e contribuir para modular a viscosidade do sistema. Em qualquer caso, tem sido visto que não afeta negativamente as propriedades do sistema, em particular as medidas de tamanho e potencial Z do sistema, tal como pode ser visto na tabela II.

Tabela II. Tamanho e potencial Z das nanocápsulas depois da incorporação de ácido hialurônico.

quitosana:		
ácido hialurônico (mg)	tamanho (nm)	Potencial Z (mV)
50:0	330	+61,6
50:10	312	+51,0
50:20	372	+38,1
50:30	481	+29,3

Um das aplicações mais interessantes do sistema da invenção é para a administração de moléculas lipofílicas, especialmente quando são compostos farmacologicamente ou cosmeticamente ativos. Os sistemas descritos na invenção têm alta capacidade para a associação de moléculas lipofílicas biologicamente ativas dentro das nanocápsulas.

Portanto, o sistema de nanocápsulas da presente invenção pode compreender adicionalmente uma molécula lipofílica biologicamente ativa na fase lipofílica capaz de prevenir, aliviar ou curar doenças.

O termo "molécula lipofílica biologicamente ativa" se refere a qualquer substância de caráter lipofílico que é usada no tratamento, cura, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou que é usada para melhorar o bem estar físico e mental de seres humanos e animais. Estas moléculas com caráter lipofílico podem incluir proteínas, peptídeos, lipídios, oligonucleotídeos modificados (lipofilizados), corticosteróides, vitaminas lipofílicas, tais como A, D, K

e E, agentes antifúngicos, agentes bacteriostáticos, agentes de cura, agentes anti-histamínicos, agentes anestésicos, agentes antipruriginosos, agentes antibióticos, agentes antivirais, agentes anti-sépticos, agentes anti-acne, agentes despigmentantes, agentes anti-seborréicos, agentes imunossupressores, fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINE), fármacos antiinflamatórios derivados de *Capsicum*.

Em uma modalidade preferida, a molécula lipofílica biologicamente ativa é ciclosporina.

Em outra modalidade preferida, a molécula lipofílica biologicamente ativa é um corticosteróide tal como, por exemplo, hidrocortisona, prednisona, fluticasona, prednisolona, triancinolona, acetono de triancinolona, dexametasona, betametasona, beclometasona, dipropionato de beclometasona.

Em uma variante preferida, o corticosteróide é valerato de betametasona.

A proporção de ingrediente ativo encapsulado nas nanocápsulas pode ser de até 5% em peso com respeito ao peso total do sistema incluindo a água; quantidades maiores poderiam reduzir a estabilidade do sistema e poderia tornar necessário adicionar uma quantidade maior de componente fosfolipídico para encapsular todo o ingrediente ativo. No entanto, a proporção adequada dependerá em cada caso do ingrediente ativo a ser encapsulado.

No caso específico de encapsular ciclosporina como ingrediente ativo, a proporção da mesma no dito sistema

deveria estar preferivelmente entre 0,01% e 5% em peso, mais preferivelmente entre 0,1% e 2%.

Quando valerato de betametasona é incorporado, a percentagem deste ingrediente que seria incluído no sistema estará preferivelmente no intervalo entre 0,01% e 3%, mais preferivelmente entre 0,05% e 0,5%.

Em outro aspecto da invenção o sistema que compreende as nanocápsulas também pode ser usado para a administração de ingredientes ativos que não têm a natureza altamente lipofílica. Nesse caso, são encapsulados nas nanocápsulas, mas estão absorvidos sobre a superfície destas últimas. Esta variante pode ser útil para a preparação de sistemas estáveis para a administração de moléculas biologicamente ativas de caráter hidrofílico, tais como peptídeos, proteínas, hormônios (insulina, LRH, LD, etc.), antígenos/alérgenos (toxóide tetânico, toxina difteria, etc.) de acordo com o objetivo é para gerar tolerância ou resposta imune, anticorpos, heparina (baixo peso molecular e não fracionada), DNA, RNA e oligonucleotídeos, entre outros.

Um segundo objeto da invenção se refere à composição farmacêutica compreendendo o sistema nanoencapsulado tal como definido anteriormente.

Exemplos de composições farmacêuticas incluem qualquer composição líquida (isto é, suspensão ou dispersão de nanocápsulas) para sua aplicação oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal ou vaginal, ou qualquer composição na forma de gel, pomada, creme ou bálsamo para sua administração tópica, ocular, nasal ou vaginal.

Em um aspecto preferido, a formulação é administrada via mucosa. A carga superficial positiva das nanocápsulas proporciona uma melhor absorção dos fármacos nas superfícies das mucosas por meio de sua interação com a mucosa e as superfícies das células epiteliais que são negativamente carregadas.

Em outro aspecto preferido, a formulação é administrada de modo intradérmico ou transdérmico, entendendo como tal, administração através de ou sobre a pele. Esta forma de administração é particularmente relevante uma vez que o sistema da invenção não somente estimula a absorção e penetração dos fármacos por via transdérmica, mas também a adesão do sistema na superfície dérmica e subsequente liberação controlada do componente ativo (tipo "depósito").

Devido a suas boas propriedades para administração sobre ou através da pele, e devido a suas características de estabilidade a longo prazo, os sistemas de nanocápsulas da invenção também são bastante adequados para aplicações cosméticas.

Portanto, um objeto adicional da presente invenção consiste de uma composição cosmética compreendendo o sistema de nanocápsulas definido previamente. Estas composições cosméticas incluem qualquer composição líquida (suspensão ou dispersão de nanocápsulas) ou qualquer composição compreendendo o sistema da invenção e que está na forma de gel, creme, pomada ou bálsamo para sua administração tópica. Ditas composições são caracterizadas porque têm propriedades emolientes, protetoras e de cura

incluso quando não têm qualquer molécula cosmeticamente ativa associada.

Em uma variante da invenção, a composição cosmética também pode incorporar moléculas ativas de natureza lipofílica que, apesar de não ter qualquer efeito terapêutico, têm propriedades como um agente cosmético. Entre as moléculas ativas que podem ser incorporadas nas nanocápsulas pode-se citar agentes emolientes, conservantes, substâncias de fragrância, agentes anti-acne, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antiperspirantes, agentes anti-caspa, despigmentantes, agentes anti-seborréicos, corantes, loções bronzeadoras, absorventes de luz UV, enzimas, substâncias de fragrância, entre outros.

As composições farmacêuticas e cosméticas podem, além disso, compreender agentes de controle de pH, tais como, por exemplo, agentes de tampão, que evitam que o pH da composição reduza a valores inferiores a 5, agentes antioxidantes, que inibem a oxidação do componente fosfolipídico e o óleo, assim como conservantes que evitam modificações estruturais importantes na formulação. Portanto, em uma variante, é usado tampão citrato na fase lipofílica, que tem uma função dupla que permite controlar o pH e agir ao mesmo tempo como agente antioxidante, e parabenos na fase hidrofílica como agentes conservantes.

Dependendo da sua função, estes componentes adicionais podem estar presentes nas fases que compõem as nanocápsulas ou no meio aquoso onde as últimas estão dispersas ou totalmente ou parcialmente absorvidas sobre os mesmos. Um

técnico no assunto pode determinar que componentes adicionais podem ser usados, e se são necessários, muitos deles sendo de uso comum em composições farmacêuticas e cosméticas.

Um objeto final da invenção se refere ao processo para a preparação do sistema da invenção tal como definido anteriormente, e que compreende nanocápsulas. Dito processo compreende, por um lado, a preparação da fase lipofílica pela dissolução do componente fosfolipídico e o óleo em um solvente orgânico. A incorporação do ingrediente ativo lipofílico opcional, tanto farmacêutico como cosmético, é realizada pela dissolução do mesmo em sua fase lipofílica junto com o componente fosfolipídico e o óleo, sem importar a ordem em que os componentes são adicionados na solução.

A escolha do solvente orgânico dependerá em grande parte do ingrediente ativo incorporado. Embora o uso de solvente orgânico farmacêuticamente aceitável, tais como, por exemplo, etanol e isopropanol ser preferível, em alguns casos, tais como quando se quer encapsular ciclosporina, em que se recorre ao uso de acetona, uma vez que solventes tais como etanol ou isopropanol, com alta afinidade pela ciclosporina, causam a difusão do ingrediente ativo à fase aquosa durante a mistura subsequente da fase aquosa e a fase lipofílica, tal como pode ser visto na seguinte tabela.

Tabela III. Influência da quantidade de ciclosporina e tipo de solvente orgânico na formação de nanocápsulas

Carga de Ciclosporina	solvente orgânico	temperatura	quitosana	resultado
--------------------------	----------------------	-------------	-----------	-----------

	etanol			agregados
1%	isopropanol			agregados
	acetona	50°C	100 mg	nanocápsulas
0,5%	acetona			nanocápsulas
2%	acetona			agregados

É preferível usar a menor quantidade possível de solvente orgânico, uma vez que têm que ser em seguida totalmente ou parcialmente eliminados durante o resto do processo.

Em uma modalidade particular, o solvente orgânico é adicionado a uma quantidade de componente fosfolipídico entre 0,005% e 0,015% em peso, uma quantidade de óleo de aproximadamente 0,025 % em peso e uma quantidade de ingrediente ativo entre 0,0025% e 0,005% em peso, todas as percentagens sendo medidas com respeito ao peso total de solvente orgânico.

Por outro lado, a fase hidrofílica é preparada dissolvendo a quitosana e o composto polioxialquilenado em água. Em uma modalidade preferida, entre 0,0005% e 0,002% em peso de quitosana e entre 0,001% e 0,005% em peso de composto polioxialquilenado são dissolvidos em água, todas as percentagens sendo medidas com respeito ao peso total de água.

Então, ambas as fases são aquecidas até uma temperatura entre 40° e 60°C, preferivelmente até 50°C e então são misturadas. Isto é surpreendente, uma vez que não é esperado que as nanocápsulas, e um sistema estável, sejam formados neste intervalo de temperaturas. Foi possível observar que se forem aquecidas acima deste máximo, as

preparações resultantes poderiam não ser adequadas devido à existência de óleo livre na suspensão. Ao contrário, se forem aquecidas abaixo de 40°C se observa o início da solidificação dos componentes lipofílicos. Este estágio de mistura pode ser realizado tanto adicionando a fase aquosa à fase orgânica, como a fase orgânica à fase aquosa, uma vez que a ordem da adição não afeta as características do sistema. Ao misturar ambas as fases, as nanocápsulas são formadas espontaneamente por um processo de deslocamento de solvente, em que quando uma fase é incorporada na outra, o solvente orgânico se difunde na fase aquosa, formando gotículas de lipídio consistindo do componente fosfolipídico, o óleo e opcionalmente o ingrediente ativo. Os últimos são caracterizados porque são altamente negativos, causando a imediata localização da quitosana ao redor deles, por interação iônica devido a sua carga positiva de polímero, que também causa, além disso, que a carga superficial do sistema também seja positiva.

Uma vez que as nanocápsulas foram formadas, o solvente orgânico usado é eliminado por qualquer método conhecido por um técnico no assunto. A eliminação do solvente orgânico é devido ao fato de que sua presença não é aconselhável em formulações farmacêuticas.

Então, um dos processos típicos na preparação de sistemas de nanocápsulas é a concentração das mesmas para aumentar a concentração de componente. Na presente invenção foi observado que o volume inicial pode ser concentrado de forma imprevista até um volume 17 vezes inferior ao da

formulação de nanocápsulas, abaixo da qual o sistema poderia começar a perder estabilidade.

Depois da eliminação do solvente orgânico ou depois do estágio de concentração, agentes adicionais descritos anteriormente podem ser adicionados (agentes de viscosidade, ácido hialurônico ou seus sais, conservantes, etc).

Se o sistema vai ser usado para a administração de moléculas biologicamente ativas não lipofílicas, podem ser adicionados depois da formação das nanocápsulas ou depois da eliminação do solvente orgânico.

Além disso, foi surpreendentemente observado que o sistema de nanocápsulas disperso em fase aquosa da presente invenção pode ser submetido a processo de esterilização a alta temperatura sem afetar sua estabilidade. Dito processo inclui, por exemplo, um processo de autoclavagem, tindalização, HTST (curta duração a alta temperatura - *high temperature short time*) e UHT (temperatura ultra-alta - *ultra high temperature*). Estes processos são conhecidos por técnicos no assunto e são realizados com o objetivo de tornar o sistema da invenção capaz de ser usado em aplicações que necessitem estar esterilizados como é o caso de aplicação por via ocular. Do mesmo modo, outra vantagem derivada desta característica é permitir que o uso de conservantes na fabricação de fórmulas comerciais que objetivam outras vias seja reduzido consideravelmente.

As condições usadas em geral para esterilização por alta temperatura podem ocasionar o derretimento das nanocápsulas e, portanto, a liberação do ingrediente ativo.

No entanto, foi possível observar que as nanocápsulas da presente invenção mantêm seu tamanho e carga superficial depois do processo de esterilização e, além disso, o surgimento de cristais de ingrediente ativo no sistema não é observado. Isto revela que não há liberação de dito ingrediente ativo das nanocápsulas para a fase aquosa.

Como uma característica adicional, é extremamente importante que os sistemas que foram submetidos ao processo de esterilização também sejam estáveis durante longos períodos de tempo, sua estabilidade foi testada em testes acelerados por pelo menos 4 meses a 37°C, equivalente a mais que um ano em condições normais, tal como é mostrado nos exemplos em anexo à invenção, portanto confirmando a exeqüibilidade industrial e comercial destes sistemas.

A continuação, alguns exemplos ilustrativos são descritos os quais revelam as características e vantagens da invenção, no entanto, não devem ser interpretados como limitantes do objeto da invenção tal como é definido nas reivindicações.

Exemplos

Como processo comum aos exemplos detalhados a continuação, as nanocápsulas foram caracterizadas do ponto de vista de tamanho, potencial Z (ou carga superficial), eficácia de encapsulamento e presença de cristais de ciclosporina A. Se realizaram estudos de estabilidade das nanocápsulas em uma estufa Heidolph (Titramax 1000) e os processos de autoclavagem em uma Presoclave 75 (Selecta).

A distribuição de tamanho foi realizada usando espectroscopia de correlação de fóton (PCS - *photon*

correlation spectroscopy; Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido) obtendo valores de tamanho médio da população de nanopartícula.

O *Potencial Z* foi medido usando anemometria de laser Doppler (LDA - *Laser Doppler Anemometry*; Zeta Sizer, Nano series, Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido). Para determinar a mobilidade eletrosmica, as amostras foram diluídas em água Milli-Q.

A liberação de *Ciclosporina A* e *Valerato de betametasona* das nanocápsulas de quitosana foi avaliada visualmente, observando se havia formação de cristais na fase aquosa e quantificando a concentração de ciclosporina por HPLC (solubilidade máxima em fase externa 16 µg/ml) ou valerato de betametasona (solubilidade máxima em fase externa 5 µg/ml), de acordo com o ingrediente ativo encapsulado. Desta maneira, se a quantidade quantificada na fase externa for igual à solubilidade máxima do ingrediente ativo é deduzido que existe formação de cristal, apesar de não ser visível.

A quitosana (Protasan UP Cl 113) usada nos exemplos é de NovaMatrix-FMC Biopolymer, a ciclosporina A de LC Laboratories, o valerato de betametasona de Guinama, o óleo de rícino de Galindo, a fosfatidilcolina de Degussa (Epikuron 135F), o poloxâmero 188 de BASF Corporation, a acetona de Vorquímica (Analema) e os produtos restantes usados são de Sigma Aldrich, sacarose, glicose e manitol.

Exemplo 1

Estudo de estabilidade de nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A em suspensão a 37°C

As nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A são preparadas tal como descrito a continuação:

a) Preparação da fase oleosa com 250 mg de lecitina, 0,5 ml de óleo de rícino, 50 ou 100 mg de ciclosporina A e 25 ml de acetona.

b) Preparação da fase aquosa com 50 mg de quitosana, 125 mg de poloxâmero 188 e 100 ml de água destilada.

c) Ambas as fases são aquecidas até 50°C, e então a fase orgânica é adicionada à fase aquosa, as nanocápsulas se formam espontaneamente.

Então, a acetona é eliminada aplicando calor (37°C) a vácuo e o volume restante é então concentrado até que restem 10 ml de água.

As nanocápsulas resultantes desta preparação têm um tamanho nanométrico inferior a um micron, e mais especificamente entre 200-700 nm, potencial Z positivo (+10 mV- +70 mV), uma eficiência de encapsulamento de ciclosporina A de praticamente 100% (isto foi diretamente quantificado depois da degradação e extração do composto ativo, e indiretamente depois da quantificação na fase aquosa externa).

As nanocápsulas foram submetidas a um estudo de estabilidade durante o qual foram armazenadas a 37°C por 6 meses, medindo o tamanho de partícula, o potencial Z e a presença de ciclosporina na fase aquosa em intervalos de 1 mês. Devido ao fato de que a ciclosporina é insolúvel em água, no caso de instabilidade a tendência é precipitar e ocasionar o surgimento de cristais visíveis.

Tabela IV:

Características de nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A (1%) armazenadas a 37°C (Média $\pm$ DP).

Tempo a 37°C (meses)	Tamanho (nm)	Potencial Z (mV)	Presença de cristais de ciclosporina A
0	474 $\pm$ 42	+42 $\pm$ 3	Não
2	541 $\pm$ 26	+37 $\pm$ 2	Não

Tal como mostrado na tabela IV, as nanocápsulas com 1% de ciclosporina, mantêm um diâmetro inferior a um micron, um potencial Z positivo, e são estáveis por pelo menos 2 meses a 37°C.

Tabela V:

Características de nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A (0,5%) armazenadas a 37°C (Média $\pm$ DP).

Tempo a 37°C (meses)	tamanho (nm)	Potencial Z (mV)	Presença de cristais de ciclosporina A	Concentração na fase aquosa externa
0	452 $\pm$ 11	+36 $\pm$ 4	Não	< 16 μ g/ml
2	601 $\pm$ 28	+21 $\pm$ 5	Não	< 16 μ g/ml
3	585 $\pm$ 13	+30 $\pm$ 1	Não	< 16 μ g/ml
4	490 $\pm$ 4	+28 $\pm$ 2	Não	< 16 μ g/ml

5	396 ± 4	+29 ± 5	Não	< 16 µg/ml
---	---------	---------	-----	------------

Tal como pode ser observado na Tabela V, as nanocápsulas de quitosana incorporando ciclosporina A (0,5%), são estáveis por pelo menos 5 meses a 37°C, mantendo um diâmetro inferior a 1 µm, potencial Z positivo e a ausência de formação de cristal de ciclosporina A, indicando que a molécula permanece no núcleo oleoso das nanocápsulas. O sistema é estável com respeito ao tamanho e potencial por um mínimo de 6 meses (tempo máximo do estudo).

Exemplo 2

Estudo de estabilidade de nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A ao processo de autoclavagem

As nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A foram preparadas de acordo com o processo descrito no exemplo 1, e, então, uma alíquota foi submetida a um processo de autoclavagem (120°C por 20 min). O objetivo principal deste estudo foi avaliar se o tamanho e potencial das nanocápsulas tinham sido modificados durante o processo de autoclavagem.

Tabela VI:

Características de nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A depois de um processo de autoclavagem (Média ± DP)

tamanho (nm)	Potencial Z (mV)	Presença de cristais de ciclosporina A	Concentração na fase aquosa externa
-----------------	---------------------	---	--

Antes do processo de autoclavagem	575 ± 5	+ 42,1 ± 0,7	Não	< 16 µg/ml
Depois do processo de autoclavagem	591 ± 11	+ 46,2 ± 0,8	Não	< 16 µg/ml

Tal como pode ser observado na Tabela VI, depois do processo de autoclavagem, as nanocápsulas mantêm seu tamanho e carga superficial. Além disso, depois do processo de autoclavagem, não apareciam cristais de ciclosporina A, o que revela que não há liberação significativa da molécula ativa das nanocápsulas para a fase aquosa.

Exemplo 3

Estudo de estabilidade de nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A submetidas a autoclavagem em suspensão a 37°C

As nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A foram preparadas de acordo com o processo descrito no exemplo 1, então foram submetidas a autoclavagem seguindo o processo descrito no exemplo 2, e foram armazenadas a 37°C por 5 meses. Com o objetivo de avaliar a estabilidade de seu sistema, o tamanho de partícula, o potencial Z e a presença de cristais de ciclosporina na fase aquosa foram medidos em intervalos de 1 mês.

Tabela VII:

Características de nanocápsulas de quitosana com ciclosporina A submetidas a autoclavagem e armazenadas a 37°C (Média ± DP).

Tempo a 37°C (meses)	tamanho (nm)	Potencial Z (mV)	Presença cristais ciclosporina A	de de na aquosa externa	Concentração fase
0	591 ± 11	+ 46 ± 1	Não		< 16 µg/ml
2	635 ± 15	+ 41 ± 1	Não		< 16 µg/ml
3	506 ± 17	+ 51 ± 1	Não		< 16 µg/ml
4	485 ± 9	+ 47 ± 1	Não		< 16 µg/ml

As nanocápsulas com ciclosporina A, revestidas com quitosana, e submetidas a autoclavagem, são estáveis a 37°C por, pelo menos, 4 meses (tabela VII).

Exemplo 4

Preparação de nanocápsulas de quitosana com valerato de betametasona

As nanocápsulas de quitosana foram preparadas com valerato de betametasona tal como descrito abaixo:

- preparação da fase oleosa com 250 mg de lecitina, 0,5 ml de óleo de rícino, 10 mg de valerato de betametasona e 25 ml de acetona.
- preparação da fase aquosa com 50 mg de quitosana, 125 mg de poloxâmero 188 e 100 ml de água destilada.
- ambas as fases são aquecidas até 50°C, e então a fase orgânica é adicionada à fase aquosa, se formam espontaneamente as cápsulas.

A emulsão obtida é concentrada (eliminando o solvente orgânico) até um volume final de 10 ml, aplicando calor (37°C) e vácuo.

As nanocápsulas resultantes dessa preparação têm um tamanho nanométrico inferior a um micron, e mais especificamente entre 200-600 nm), potencial Z positivo (+25 mV- +60 mV), uma eficiência de encapsulamento de valerato de betametasona de 99,9% (isto foi quantificado indiretamente depois da quantificação da fase aquosa externa). Mais especificamente, as características físico-químicas e eficiência de encapsulamento das nanocápsulas são descritas na Tabela VIII.

Tabela VIII:

Características físico-químicas e eficiência de encapsulamento de nanocápsulas de quitosana com valerato de betametasona (Média $\pm$ DP).

Tamanho (nm)	Potencial Z (mV)	Eficiência de encapsulamento (%)
348 $\pm$ 71	+ 46,9 $\pm$ 1,3	99,94 $\pm$ 0,01

Exemplo 5

Estudo de estabilidade de nanocápsulas de quitosana com valerato de betametasona em suspensão a temperatura ambiente

As nanocápsulas preparadas tal como indicado no exemplo 4, foram submetidas a um estudo de estabilidade, em que foram armazenadas a temperatura ambiente durante 6 meses, medindo o tamanho de partícula, o potencial Z e a

presença de valerato de betametasona na fase aquosa. Tal como mostrado na Tabela IX, mantém tamanho nanométrico, potencial Z positivo, e o valerato de betametasona permanece nos núcleos lipídicos das nanocápsulas.

Tabela IX:

Características de nanocápsulas de quitosana com Valerato de betametasona armazenadas a temperatura ambiente (Média $\pm$ DP).

Tempo a temp. ambiente (meses)	tamanho (nm)	Potencial Z (mV)	Concentração na fase aquosa externa
0	383 $\pm$ 41	+ 46,9 $\pm$ 1,3	<5 μ g/ml (0,6 μ g/ml)
6	413 $\pm$ 10	+ 48,2 $\pm$ 2,6	<5 μ g/ml (0,9 μ g/ml)

Exemplo 6

Estudo de estabilidade de nanocápsulas de quitosana com valerato de betametasona em suspensão a 37°C

As nanocápsulas preparadas tal como indicado no exemplo 4, foram submetidas a um estudo de estabilidade, em que foram armazenadas a 37°C por 6 meses, medindo o tamanho de partícula, potencial Z e a presença de valerato de betametasona na fase aquosa. As nanocápsulas de quitosana com valerato de betametasona são estáveis tal como mostrado na tabela X.

Tabela X:

Características de nanocápsulas de quitosana com valerato de betametasona armazenadas a 37°C (Média $\pm$ DP).

Tempo a 37°C (meses)	tamanho (nm)	Potencial Z (mV)	Concentração na fase aquosa externa
0	383 $\pm$ 41	+ 46,9 $\pm$ 1,3	<5 μ g/ml (0,6 μ g/ml)
6	465 $\pm$ 14	+ 58,4 $\pm$ 1,8	<5 μ g/ml (1,5 μ g/ml)

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema que compreende nanocápsulas com um tamanho médio inferior a 1 μm dispersas em um meio aquoso, **caracterizado** porque as nanocápsulas têm uma estrutura compreendendo:

a. uma fase lipofílica compreendendo:

a.1) pelo menos, um componente fosfolipídico; e

a.2) um óleo que compreende um ou mais ácidos graxos de cadeia $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$ saturada e/ou insaturada ou derivados dos mesmos;

b. uma fase hidrofílica compreendendo:

b.1) quitosana ou um derivado da mesma; e

b.2) um composto polioxialquilenado.

2. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** porque o componente fosfolipídico compreende fosfoglicerídios, preferivelmente selecionados de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidilcolina, ácido fosfatídico e misturas dos mesmos.

3. Sistema, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** porque o componente fosfolipídico compreende lecitina, preferivelmente lecitina de soja.

4. Sistema, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** porque a lecitina tem uma proporção de fosfatidilcolina entre 35% e 75% em peso, preferivelmente entre 35% e 55%.

5. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** porque o óleo compreende óleo de rícino.

6. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** porque o composto polioxialquilenado é um polioxietileno ou um copolímero de óxido de etileno-óxido de propileno.

5 7. Sistema, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** porque o composto polioxietilenado compreende um poloxâmero, preferivelmente poloxâmero 188.

10 8. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** porque a proporção de componente fosfolipídico no sistema está entre 0,1% e 10% em peso com respeito ao peso total incluindo a água, preferivelmente entre 0,5% e 5%, mais preferivelmente entre 1% e 2,5% em peso.

15 9. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** porque a proporção de óleo no sistema está entre 1% e 20% em peso com respeito ao peso total incluindo a água, preferivelmente entre 2,5% e 10%, mais preferivelmente entre 4,5% e 5,5% em peso.

20 10. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** porque a proporção de quitosana no sistema está entre 0,05% e 10% em peso com respeito ao peso total incluindo a água, preferivelmente entre 0,1% e 2%, mais preferivelmente entre 0,25% e 1% em peso.

25 11. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** porque a proporção do composto polioxialquilenado no sistema está entre 0,05% e 10% em peso com respeito ao peso total incluindo a água, preferivelmente entre 0,1% e 5%, mais preferivelmente entre

1% e 2,5%.

12. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** porque o meio aquoso adicionalmente compreende um polímero hidrofílico de viscosidade.

13. Sistema, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** porque o polímero de viscosidade é selecionado de entre poli(álcool vinílico), polivinilpirrolidona, quitosana, poloxâmeros, polietilenoglicol e misturas dos mesmos.

14. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** porque adicionalmente compreende ácido hialurônico ou quaisquer de seus sais.

15. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 14, **caracterizado** porque as nanocápsulas têm um tamanho médio de entre 1 e 999 nm, preferivelmente entre 50 e 800 nm, mais preferivelmente entre 200 e 700 nm.

16. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 15, **caracterizado** porque as nanocápsulas têm uma carga superficial positiva, preferivelmente representada por um potencial Z entre +1 mV e +70 mV.

17. Sistema, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 16, **caracterizado** porque adicionalmente compreende uma molécula lipofílica biologicamente ativa na fase lipofílica das nanocápsulas.

18. Sistema, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** porque as moléculas lipofílicas biologicamente ativas são selecionadas do grupo consistindo de proteínas, peptídeos, lipídios, oligonucleotídeos

lipofilizados, corticosteróides, vitaminas lipofílicas, tais como A, D, K e E, agentes antifúngicos, agentes bacteriostáticos, agentes de cura, agentes anti-histamínicos, agentes anestésicos, agentes antipruriginosos, agentes antibióticos, agentes antivirais, agentes anti-sépticos, agentes anti-acne, agentes despigmentantes, agentes anti-seborréicos, agentes imunossupressores, fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINE) e antiinflamatórios derivados de *Capsilum*.

19. Sistema, de acordo com as reivindicações 17 ou 18, **caracterizado** porque a proporção da molécula lipofílica biologicamente ativa na nanocápsula é de até 5% em peso com respeito ao peso total do sistema incluindo a água.

20. Sistema, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** porque a molécula lipofílica é ciclosporina.

21. Sistema, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** porque a proporção de ciclosporina na nanocápsula está entre 0,01 e 2% em peso com respeito ao peso total do sistema incluindo a água.

22. Sistema, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** porque a molécula lipofílica é hidrocortisona, prednisona, fluticasona, prednisolona, triancinolona, acetonido de triancinolona, dexametasona, betametasona, valerato de betametasona, beclometasona, dipropionato de beclometasona, preferivelmente valerato de betametasona.

23. Sistema, de acordo com quaisquer das

reivindicações 1 a 16, **caracterizado** porque adicionalmente compreende uma molécula biologicamente ativa de caráter hidrofílico adsorvida na superfície da nanocápsula, selecionada de peptídeos, proteínas, hormônios, antígenos/alérgenos, anticorpos, heparina, DNA, RNA e oligonucleotídeos.

24. Composição farmacêutica, **caracterizada** porque compreende um sistema tal como aquele definido em quaisquer das reivindicações 1 a 23.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizada** porque é para administração por via oral, bucal, sublingual, tópica, ocular, nasal ou vaginal.

26. Composição cosmética, **caracterizada** porque compreende um sistema tal como aquele definido em quaisquer das reivindicações 1 a 19.

27. Composição, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada** porque compreende uma molécula lipofílica cosmeticamente aceitável que é selecionada de agentes emolientes, conservantes, substâncias de fragrância, agentes anti-acne, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antiperspirantes, agentes anti-caspa, despigmentantes, agentes anti-seborréicos, corantes, loções bronzeadoras, absorventes de luz UV, enzimas e substâncias de fragrância.

28. Composição, de acordo com quaisquer das reivindicações 24 a 27, **caracterizada** porque adicionalmente compreende agentes de controle de pH, agentes antioxidantes ou conservantes.

29. Processo para a preparação de um sistema,

conforme descrito em quaisquer das reivindicações 1 a 22,
caracterizado porque compreende:

- a. preparação da fase lipofílica dissolvendo o componente fosfolipídico e o óleo em um solvente orgânico, e opcionalmente uma molécula lipofílica como ingrediente ativo;
- b. preparação da fase hidrofílica dissolvendo a quitosana e o composto polioxialquilenado em água;
- c. aquecimento de ambas as fases até uma temperatura entre 40 e 60°C;
- d. misturar a fase lipofílica e hidrofílica agitando com formação espontânea das nanocápsulas; e
- e. eliminação do solvente orgânico.

RESUMO

SISTEMA QUE COMPREENDE NANOCÁPSULAS, COMPOSIÇÕES
FARMACÊUTICA E COSMÉTICA CONTENDO O SISTEMA E PROCESSO PARA
A PREPARAÇÃO DO MESMO

5 A invenção se refere a sistemas de nanocápsulas
caracterizados porque têm alta estabilidade durante longos
períodos de tempo. Estes sistemas são úteis para a
liberação controlada de ingredientes cosmeticamente ou
farmacologicamente ativos de natureza altamente lipofílica.

10 O sistema compreende nanocápsulas com um tamanho médio
inferior a 1 μm dispersas em um meio aquoso, em que as
nanocápsulas têm uma estrutura compreendendo uma fase
lipofílica contendo um componente fosfolipídico e um ou
mais ácidos graxos de cadeia $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$ saturada e/ou

15 insaturada ou derivados dos mesmos; e uma fase hidrofílica
que compreende quitosana ou um derivado da mesma e um
composto polioxialquilenado.