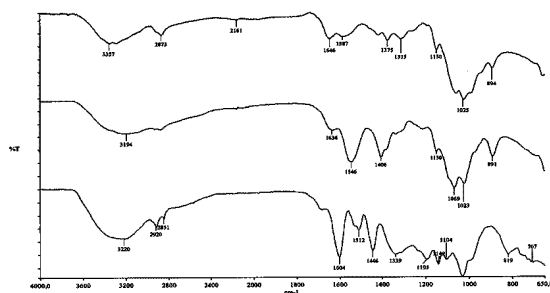




* R R P T 1 1 0 4 6 6 9 A 2 *

A61K 9/51
A61K 47/36
A61K 36/48
A61P 17/00
A61P 29/00
A61P 31/04
C08B 37/08

(57) Resumo: NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE EXTRATOS VEGETAIS A matéria tratada descreve formulações farmacêuticas contendo nanopartículas poliméricas capazes de veicular extratos vegetais e suas aplicações. As formulações apresentadas podem ser produzidas a partir do polímero natural quitosana e de seus derivados, podendo ser utilizadas para veiculação tópica (pele e mucosas) controlada de extratos vegetais com atividade terapêutica.



“NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE EXTRATOS VEGETAIS”

A matéria tratada é descrita por formulações farmacêuticas que contém nanopartículas poliméricas, capazes de veicular extratos vegetais e suas aplicações. As formulações apresentadas podem ser produzidas a partir do polímero natural quitosana e de seus derivados, podendo ser utilizadas para a veiculação tópica (pele e mucosas) controlada de extratos vegetais com atividade terapêutica.

Apesar dos estudos e tratamentos relacionados à terapia de diversas patologias cutâneas, tais como a psoríase, as dermatites e as queimaduras, ainda, os tratamentos são complexos e muitas vezes, poucos efetivos. No caso da psoríase e das dermatites, por exemplo, os fármacos de primeira escolha são os corticosteróides (administrados por via tópica), cujos efeitos adversos são conhecidos no Estado da Técnica. Para as queimaduras, o tratamento medicamentoso visa evitar danos maiores ao paciente ao contrário de evitar a progressão da lesão tecidual (AKDIS, C. A. et al. *Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/ American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report, Food allergy, dermatologic diseases and anaphylaxis*, v. 118, n. 1, p. 152-169, 2006; RABOOBEE, N. et al. *Guideline on the management of psoriasis in South Africa. South African Medical Journal*, v. 100, n. 4, p. 255-282, 2010).

Por outro lado, o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas de um total estimado entre 350 e 550 mil e a investigação do potencial de aplicação dessas plantas na terapia de diversas doenças é uma constante na literatura (DIAS, B. F. S. *A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades*, André Tosello: Campinas, p.10, 1996).

Para o gênero *Stryphnodendron*, estudos preliminares mostraram significativas atividades biológicas como: cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, antiulcerosa, moluscocida, antibacteriana, antitirosinase e interferente no metabolismo energético em fígado de ratos (BAURIN, N. et al.

- Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 155-158, 2002; BEZERRA, J. C. B. et al. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, v. 73, p.428-430, 2002; LOPES, G. C. et al.
- 5 Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 265–272, 2005; REBECCA M A et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology Letters*, v.143, p.55-63, 2003; SOUZA, T. M. et al.
- 10 Outro estudo mostra uma avaliação da atividade antisséptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e da preparação cosmética contendo este extrato (*Rev. Bras. de Farmacognosia*, v. 73, n. 1, p. 71-75, 2007).

- Por outro lado, o extrato fitoterapêutico das cascas de *S. adstringens*
- 15 não se mostrou genotóxico em células germinativas e somáticas da *Drosophila melanogaster*, demonstrando que os extratos vegetais desse gênero seriam adequados para aplicações tópicas em diversas doenças (SOUSA, N. C. et al. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *D. melanogaster*.
- 20 *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 41, n. 4, p. 293-9, 2003).

- A aplicação de medicamentos por via tópica pode ser feita através da pele ou das mucosas. A absorção transepidérmica está associada às características físico-químicas do fármaco e ao estado de oclusão da pele. Assim, alterações nesses parâmetros podem ser utilizadas para aumentar a
- 25 absorção do fármaco (TING, W. W.; VEST, C. D.; SONTHEIMER, R. D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. *International Journal of Dermatology*, v. 43, p. 538-547, 2004). As alterações nas características físico-químicas dos fármacos normalmente envolvem a síntese de novas moléculas, o que torna a
- 30 utilização de promotores de absorção, que de alguma forma alteram a estrutura do estrato córneo, uma alternativa mais interessante para aumentar a absorção transepidérmica do fármaco.

Nesse sentido, a absorção pode ser aumentada pelo uso de agentes que aumentam a hidratação da pele (água, emolientes, filmes oclusivos, adesivos transdérmicos); alteram a estrutura do estrato córneo por extração, descontinuação ou alteração da bicamada lipídica (solventes polares como dimetilsulfóxido e vesículas como lipossomas); alteram fisicamente a estrutura do estrato córneo (laser e microagulhas); desorganizam o estrato córneo por alterações elétricas (iontoforese); reduzem a resistência da pele ao transporte de água (eletroforese); geram cavitação na pele (sonoforese) ou movem materiais magnéticos por meio da pele (magnetoforese) (TANNER, T.; MARKS, R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Research and Technology*, v. 14, p. 249-260, 2008; TING, W. W.; VEST, C. D.; SONTHEIMER, R. D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. *International Journal of Dermatology*, v. 43, p. 538-547, 2004).

Outra abordagem é o uso de polímeros como promotores de absorção. Estudos recentes demonstraram, por exemplo, que o quitosana é capaz de aumentar a permeabilidade paracelular da mucosa epitelial intestinal, nasal e bucal pela abertura transitória das junções intercelulares. Essas mesmas junções foram encontradas na pele, o que sugere o uso desse polímero como promotor de absorção na pele (VALENTA, C.; AUNER, B.G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 279-289, 2004). Outras pesquisas também descrevem um aumento da penetração celular de fármacos por meio da utilização de quitosana como carreador (DI COLO, G. et al. Effect of chitosan on *in vitro* release and ocular delivery of ofloxacin from erodible inserts based on poly(ethylene oxide). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 248, p. 115-122, 2002; DI COLO, G. et al. Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 273, p. 37-44, 2004). Essa característica foi detectada em células cuja membrana apresenta carga negativa. Neste caso, como o quitosana oferece a possibilidade de ser veiculada na sua forma ácida, na qual o nitrogênio do grupo amino na posição

C-2 está protonado, a carga positiva gerada aumenta as interações com a membrana aumentando também o tempo de residência neste local. Assim, como o fármaco está sendo carregado pelo polímero, há aumento de seu tempo de residência no local de ação por causa da interação polímero-fármaco-membrana. Consequentemente, a possibilidade de absorção intracelular do fármaco é aumentada.

Por outro lado, nas últimas décadas, a mucoadesão se tornou de grande interesse no desenvolvimento de produtos farmacêuticos devido ao seu potencial em aumentar o tempo de residência da formulação na mucosa, aumentar a retenção da droga na região de aplicação sem impedir a absorção sistêmica, aumentar a biodisponibilidade e aumentar a eficácia e a segurança do fármaco por reduzir a concentração efetiva. Assim, a mucoadesão é a capacidade de ligação de uma determinada substância a uma mucosa. Este fato está relacionado a um contato íntimo e prolongado entre fármaco/polímero e os tecidos absorventes, tais como pele e mucosas ocular, nasal, oral, vaginal, gastrointestinal e retal e, também, com a possibilidade de se evitar o metabolismo hepático de primeira passagem (ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 505-518, 2009; SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1556-1568, 2005). Outras vantagens das formulações mucoadesivas são a redução da degradação enzimática, devido ao contato do fármaco com a superfície de absorção e inibição das enzimas de membrana, a liberação da droga em sítio específico, e redução do custo total da formulação devido à redução da quantidade de fármaco utilizada (ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 505-518, 2009).

As formulações mucoadesivas para a liberação de fármacos têm sido desenvolvidas na forma de comprimidos, filmes e sistemas particulados, em que, dentre outras possibilidades, os polímeros mucoadesivos formam a matriz na qual o medicamento é disperso ou a barreira através da qual o fármaco

deve se difundir (SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1556-1568, 2005). A característica mucoadesiva dos polímeros empregados nestas formulações não é surpreendente. Sua constituição possibilita a formação de ligações químicas secundárias (interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio) e de ligações covalentes, além de desenvolverem interações eletrostáticas com moléculas com carga oposta (SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1666-1691, 2005; SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1556-1568, 2005).

Duas classes de polímeros mucoadesivos já foram aprovadas pela agência reguladora americana, FDA (Food and Drug Administration): os derivados aniônicos de ácido poliacrílico e as quitosanas catiônicas (FLORENCE, A. T.; ATTWOOD D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. Edusp: São Paulo, 2003).

O quitosana é um polímero natural derivado da quitina. É obtido a partir do exoesqueleto de insetos e crustáceos (HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J. of Controlled Release*, v. 89, p. 151-165, 2003).

O quitosana e a quitina apresentam estruturas similares às da celulose. A molécula de quitosana é hidrofílica como a celulose e a quitina, por ter um grande número de grupos hidroxila. No entanto, possui melhor solubilidade e reatividade que esse dois polímeros, devido aos grupos amino presentes em sua estrutura. Ela ainda apresenta propriedades antimicrobianas e curativas de feridas (LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1595-1639, 2005). Tudo isso, faz com que esse polímero tenha diversas aplicações na indústria alimentícia, indústria cosmética, gestão de resíduos, tratamento de água, cicatrização e reparo tecidual, liberação de fármacos e genes, dentre outros (LAVERTU, M. et al. A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*

Analysis, v. 32, p. 1149-1158, 2003). Em função de ser um polímero atóxico, biocompatível e biodegradável (características desejáveis e necessárias a polímeros usados como veículos para fármacos), a quitosana tem sido utilizada como veículo em diversas formulações farmacêuticas, como pós, comprimidos, emulsões e géis (LIU, W. G.; YAO, K. D. Chitosan and its derivatives- a promising non viral vector for gene transfection. *Journal of Controlled Release*, v. 83, p. 1-11, 2002; GIANNANTONI, A. et al. New frontiers in intravesical therapies and drug delivery. *European Urology*, v. 50, p. 1183-1193, 2006; VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1692-1712, 2005; Zheng, F. et al. Chitosan nanoparticle as gene therapy vector via gastrointestinal mucosa administration: Results of an *in vitro* and in vivo study. *Life Science*, v. 80, p. 388-396, 2007).

Além de todas as características supracitadas, a quitosana tem se mostrado um material mucoadesivo promissor em valores de pH fisiológicos por possuir grupos amino ($-NH_2$) e hidroxila ($-OH$) que podem dar origem a ligações químicas secundárias como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1692-1712, 2005). Essa propriedade tem sido ilustrada em diversas pesquisas. Um estudo apresentou a capacidade da quitosana de aderir à mucosa gástrica *in vitro*, o que pode sugerir uma liberação local específica do fármaco e, também, prolongar o tempo de residência da formulação no local de ação, com a consequente melhora da absorção do fármaco (GÅSERØD, O. et al. The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 175, p. 237-246, 1998; GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006). Outro trabalho mostrou um aumento de três vezes no tempo de residência pré-corneal da tobramicina com a adição de quitosana nas formulações, em comparação com a solução comercial do fármaco (FELT, O. et al. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance,

assessment and evaluation of precorneal retention. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 180, p. 185-193, 1999).

As nanopartículas poliméricas de quitosana têm sido consideradas muito apropriadas para a liberação controlada de drogas, principalmente devido à sua boa estabilidade, baixa toxicidade e simples preparação, o que normalmente não envolve o uso de solventes orgânicos. Existem diversos métodos para a produção das nanopartículas. Dentre eles encontram-se os métodos de emulsificação, coprecipitação, coacervação por complexação, complexação polieletrólítica, nebulização (*spray drying*) e gelatinização ionotrópica (NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010; SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 11, p. 11-14, 2010).

O método da gelatinização ionotrópica é realizado pela adição de um poliânion (dioctilsufosuccinato de sódio, tripolifosfato, dentre outros) a uma solução de quitosana em ácido acético, sob agitação mecânica, à temperatura ambiente e se baseia na interação eletrostática dos resíduos aminados do polímero carregados positivamente com as cargas negativas do poliânion (NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010; KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 84, p. 163-171, 2011). Esse método foi recentemente usado para incorporação de quercetina e as nanopartículas obtidas apresentaram atividade antioxidante adequada (ZHANG, Y. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 107, p. 891-897, 2008). Da mesma forma, os extratos de *Elsholtzia splendens*, uma planta que também apresenta atividade antioxidante, foram incorporados a nanopartículas de quitosana pelo método de gelatinização ionotrópica e foi observado um aumento da atividade antioxidante do extrato após incorporação

nas nanopartículas (LEE, J.; KIM, G.; LEE, H. G. Characteristics and Antioxidant Activity of *Elsholtzia splendens* Extract-Loaded Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 3316-3321, 2010).

A utilização de nanopartículas poliméricas para liberação de fármacos isolados já é bem descrita na literatura. Exemplos são os documentos de patente US12059483 (Biodegradable nanoparticle incorporationg highly hydrophilic positive charged drugs), que descreve a produção de nanopartículas poliméricas biodegradáveis para administração oral de fármacos hidrofílicos; US12311479 (Mucoadhesive nanoparticles for cancer treatment), que descreve a produção de nanopartículas mucoadesivas contendo um monoéster de ácido graxo e quitosana para liberação de agentes terapêuticos anticancerígenos; US12008556 e US11442192 (Nanoparticles for drug delivery), que descrevem a produção de nanopartículas de quitosana e poli-(ácido láctico-ácido glicólico) para veiculação de inibidor da HMG-CoA redutase ou eritropetina.

O mesmo acontece para nanopartículas de quitosana e ciclodextrina, empregadas para a liberação de agentes terapêuticos, US11916283 (Nanoparticles comprising chitosan and cyclodextrin).

Outros trabalhos descrevem a possibilidade de utilização das nanopartículas poliméricas para liberação controlada de agentes terapêuticos, como pode ser observando nos documentos de patente americanos: US11968084 (Pharmaceutical compositions and use thereof), que descreve a obtenção de nanopartículas ou nanocápsulas para liberação controlada e aumento de atividade de antimicrobianos e US12016186 (Methods for drug delivery of bioactive substances with biodegradable polyphosphates), que descreve a obtenção de sistemas poliméricos para liberação controlada de substâncias bioativas (drogas e genes), a partir de sistemas biodegradáveis de derivados de polifosfatos.

Alguns métodos para obtenção de nanopartículas também já são bem descritos. Na patente US12485399 (Drug loaded polymeric nanoparticles and methods of making and using same), por exemplo, os métodos de obtenção de nanopartículas contendo dibloco poli-(ácido láctico)-polietilenoglicol contendo um

agente terapêutico (especialmente antitumorais) são descritos. Tanto o método da nanoprecipitação como o método da emulsificação envolve a dispersão do polímero em solvente orgânico, o que é pouco interessante tendo em vista os riscos de toxicidade e de explosão. O mesmo acontece na patente

5 US12485467 (Therapeutic polymeric nanoparticles comprising vinca alkaloids and methods of making and using same), que descreve a obtenção de nanopartículas para veiculação de alcalóides da vinca, pelo método de emulsão, utilizando os polímeros poli(ácido láctico)-polietilenoglicol; poli(ácido láctico – ácido glicólico)-polietilenoglicol; poli(ácido láctico) e poli(ácido láctico-

10 ácido glicólico); poli(ácido láctico-polietilloglicol) e poli (ácido láctico – ácido glicólico).

No entanto, nos documentos supracitados, não houve relatos acerca do encapsulamento de extratos vegetais, em nanopartículas poliméricas.

A possibilidade de precipitação de nanopartículas por variação de

15 temperatura é descrita no documento de patente US7081489 (Polymeric encapsulation of nanoparticles). No entanto, o gasto de energia para aquecimento onera o processo produtivo e o torna desvantajoso industrialmente.

A incorporação de agentes terapêuticos por meio de ligação covalente

20 com o polímero é descrita na patente US10570461 (Nanoparticles for drug-delivery). Além de o processo de produção das nanopartículas ser a microemulsão, envolvendo o uso de solventes orgânicos, a necessidade de reação química torna o processo pouco interessante porque aumenta o número de etapas no processo produtivo industrial.

25 O método de precipitação de quitosana com poliânions para obtenção de nanopartículas é descrito nas patentes US7901666 (Nanoparticles for protein drug delivery) e US12680728 (Methods and compositions involving chitosan nanoparticles). Os poliânions mais utilizados são os polifosfatos. Em nenhum dos documentos, os extratos vegetais foram fornecidos como exemplos de

30 agentes terapêuticos a serem incorporados.

As nanopartículas poliméricas para liberação controlada de compostos isolados de extratos vegetais de *Albisia chinensis* foram produzidas utilizando-

se o poli(ácido láctico) como polímero e o método da evaporação do solvente (KUMARI, A. et al. Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v 82, p. 224-232, 2011). Novamente, a utilização de solventes, pouco recomendada para os processo industriais é uma limitação da técnica. Lee verificou que as nanopartículas poliméricas de quitosana foram produzidas para veiculação de extratos de *Elsholtzia splendens* (LEE, J.; KIM, G.; LEE, H. G. Characteristics and Antioxidant Activity of *Elsholtzia splendens* Extract-Loaded Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 3316-3321, 2010). No entanto, essas partículas são produzidas para aumentar a estabilidade do extrato e não há relatos de que promovam a liberação controlada do extrato vegetal.

Diante do exposto, pode-se dizer que, embora as nanopartículas poliméricas de quitosana já sejam descritas na literatura, a possibilidade de utilização dessas nanopartículas como veículos para liberação prolongada de extratos vegetais ainda não foi aventada. Considerando que extratos vegetais são fontes muito ricas de produtos terapêuticos e, tendo em vista que, em geral, a atividade de um extrato vegetal está associada a uma ação sinérgica dos seus constituintes e não à ação de componentes isolados (WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 401-409, 2001), a incorporação desses extratos complexos em formulações de liberação controlada, sem que haja perda de atividade, se torna um desafio tecnológico ainda não explorado na literatura.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Figura 1** mostra os espectros de absorção da região do infravermelho; onde: (a) fração orgânica do extrato padronizado de *Stryphnodendron obovatum* Benth., (b) nanopartículas poliméricas de quitosana “brancas” (controle) e (c) nanopartículas poliméricas de quitosana contendo *S. obovatum*.

A **Figura 2** mostra as micrografias eletrônicas de varredura obtidas para as nanopartículas poliméricas de quitosana “brancas”, onde: (a) aglomerados de nanopartículas e (b) nanopartícula individualizada (cabeças de seta).

A **Figura 3** mostra as micrografias eletrônicas de varredura obtidas para as nanopartículas poliméricas de quitosana, contendo o extrato padronizado de *Stryphnodendron obovatum* Benth.. As nanopartículas estão evidenciadas pelas setas em (a) e (b).

5 A **Figura 4** mostra o perfil de liberação *in vitro* do extrato para as nanopartículas poliméricas, contendo o extrato padronizado de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

10 A **Figura 5** mostra o perfil de liberação *in vitro* diário de extrato para nanopartículas poliméricas contendo extrato padronizado de *Stryphnodendron obovatum* Benth.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A matéria tratada descreve as formulações farmacêuticas contendo nanopartículas poliméricas capazes de veicular extratos vegetais, seu processo de preparação e aplicação. As formulações apresentadas podem ser reduzidas a partir do polímero natural quitosana e de seus derivados, podendo ser utilizadas para veiculação tópica (pele e mucosas) de extratos vegetais, como os extratos de *Stryphnodendron obovatum* Benth., *Stryphnodendron adstringens* M., *Stryphnodendron polyphyllum* M. e *Dimorphandra mollis* Bth. com atividades terapêuticas diversas como cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, antiulcerosa e antibacteriana, por exemplo.

Alguns exemplos, não limitantes, permitem uma melhor compreensão da matéria tratada; conforme mencionados a seguir.

Exemplo 1: Preparação do extrato vegetal

O córtex do caule da planta foi secado em uma estufa, a uma temperatura inferior a 40°C, e triturado. Posteriormente, esse material vegetal foi extraído por maceração estática fracionada, por meio de um solvente orgânico, preferencialmente etanol, acetato de etila, metanol, e secado a seguir. Após a obtenção do extrato, foi realizada uma purificação com o objetivo de eliminar os interferentes da matriz vegetal (taninos de alto peso molecular). Essa purificação foi realizada por extração líquido-líquido. A extração continha uma fase orgânica (solvente(s) orgânico(s) pouco

miscível(is) ou imiscível(is) em água) e uma fase aquosa (solvente(s) orgânico(s) miscível(is) em água e/ou água), em proporções que variaram, de 10 a 90% para a fase orgânica, e 90 a 10% para a fase aquosa. A Tabela 1 exemplifica uma composição formada por uma mistura de solventes.

- 5 Tabela 1 – Composição do sistema de purificação para o extrato seco, por partição líquido-líquido e quantidade de amostra utilizada.

Fase	Composição	Volume (mL)	Amostra (mg)
Orgânica	Acetato de etila	1 a 4	250,0
	Butanol	0,1 a 1,0	
	2-propanol	0,1 a 1,0	
	(isopropanol)		
Aquosa	Água purificada	2 a 10	

- Para o processo de separação líquido-líquido, o extrato seco foi pesado e transferido para um funil de separação. As fases aquosa e orgânica foram adicionadas e a mistura resultante foi agitada vigorosamente. Em seguida,
- 10 essa mistura foi deixada em repouso até a completa separação de fases. A fase orgânica foi recolhida em uma cápsula de porcelana, enquanto a fase aquosa (previamente removida) foi novamente extraída com a fase orgânica. Após a extração, essa fase orgânica foi adicionada à fase orgânica previamente recolhida. As fases orgânicas foram, então, secadas. Os extratos
- 15 foram padronizados pelo método cromatográfico previamente desenvolvido (NASCIMENTO, A. M.; GUEDES, P. T.; CASTILHO, R. O.; SOARES, C. D. V. Protocolo de Patente 14090003895. Método extrativo-analítico para determinação de taninos em insumos e produtos vegetais, 2009.) e a média do conteúdo encontrado foi 1,22% e 1,42%, para a galocatequina e galato de
- 20 epigalocatequina, respectivamente para *S. obovatum*.

Exemplo 2: Preparação das nanopartículas poliméricas

- Para a obtenção das nanopartículas, foi preparada uma dispersão de quitosana em uma solução aquosa ácida. A concentração do polímero pode variar de 0,1 a 10 mg/mL, preferencialmente entre 1 e 2 mg/mL. O ácido a ser
- 25 utilizado pode ser um ácido inorgânico, preferencialmente HCl, H₃PO₄, H₂SO₄

ou ácido orgânico, preferencialmente o ácido acético, ácido cítrico ou ácido ascórbico. A concentração do ácido pode variar de 0,5 a 50 mg/mL. A fração orgânica do extrato seco, obtida como descrito previamente ou por qualquer outro método de separação (por exemplo, extração em fase sólida e cromatografia, dentre outras) foi adicionada à dispersão de quitosana. A
 5 concentração do extrato pode variar entre 0,1 e 20 % da concentração de quitosana, mas está, preferencialmente, entre 5 e 15 %. Após a agitação para uma completa dispersão do polímero, uma solução aquosa contendo um poliânion foi adicionada à dispersão de quitosana. O poliânion a ser utilizado foi
 10 preferencialmente o dioctilsulfosuccinato ou o tripolifosfato (associados a qualquer cátion monovalente, preferencialmente Na⁺, K⁺ e NH₄⁺).

A concentração do poliânion pode variar de 0,1 a 10 mg/mL, preferencialmente entre 0,5 e 2,0 mg/mL. O volume de solução de quitosana pode variar, preferencialmente, numa razão de 1-3 mL de solução de poliânion
 15 para cada 5 mL de dispersão de quitosana. A dispersão obtida foi agitada em um intervalo de tempo de um a dez minutos, em ultraturrax, com uma velocidade de agitação compreendida entre 1000 e 20000 rpm; a fim de garantir uma mistura eficiente entre o polímero e o agente de precipitação. Em seguida, foi colocada em uma sonda ultrassônica por 1 a 10 minutos, a uma
 20 amplitude de 21% para uma redução do tamanho das nanopartículas. A formulação obtida foi centrifugada para a separação do polímero, onde não houve formação de nanopartículas.

A Tabela 2 exemplifica algumas concentrações dos reagentes que constituem uma solução de quitosana.

25 Tabela 2 – Solução de quitosana com o extrato.

Constituinte	Concentração (mg/mL)
Quitosana	1,75
Ácido acético	3,06
<i>Extrato padronizado de S. obovatum</i>	0,20

Após agitação mecânica ou magnética da formulação 1 por 24 horas, adicionou-se 2 mL de uma solução de tripolifosfato de sódio, 1 mg/mL a 5 mL

da formulação 1. Após a adição do poliânion, a mistura pode ser agitada em ultraturrax a 10000 rpm por 5 min, por exemplo, e sonicada por 5 min. Após a centrifugação a 3600 rpm, por 5 min, recolheu-se o sobrenadante, contendo as nanopartículas.

- 5 Paralelamente ao desenvolvimento das nanopartículas com o extrato, foram desenvolvidas as nanopartículas “brancas” (sem o extrato). Para isso, o mesmo procedimento descrito anteriormente (Exemplo 2) foi realizado, eliminando-se a etapa de dissolução do extrato na dispersão de quitosana.

Exemplo 3: Caracterização e propriedades das formulações

- 10 As formulações obtidas apresentaram-se como dispersões levemente turvas. A formulação sem o extrato se mostrou levemente esbranquiçada, enquanto a formulação contendo o extrato adquiriu uma cor levemente marrom, no caso do extrato de barbatimão.

- 15 No espectro de absorção na região do infravermelho das nanopartículas poliméricas contendo o extrato (Figura 1), podem ser observadas as bandas de absorção características do quitosana (banda I de amida (C=O) entre 1630 e 1640 cm^{-1} ; sobreposição de banda II de amida e vibração de N-H de amina, entre 1540 e 1550 cm^{-1} ; sobreposição de bandas de estiramento de O-H e C-H entre 3100 e 3250 cm^{-1} ; estiramento C-H de ligação β -glicosídica próximo a 20 890 cm^{-1} e bandas de vibração C-O-C e C-O entre 1200 e 950 cm^{-1} , que foram preservadas na formulação, sem grandes deslocamentos de posição, sugerindo que não houve reação do polímero com o extrato. Adicionalmente, é possível observar a intensificação da banda em torno de 1406 cm^{-1} , correspondente ao estiramento C=C das ligações dos anéis aromáticos dos 25 constituintes do extrato. As outras bandas correspondentes a esse estiramento (entre 1600 e 1550 cm^{-1}) não puderam ser observadas em virtude da sobreposição com as bandas características do polímero. Mais ainda, pode-se observar um alargamento e sobreposição das bandas observadas na região de 3000 a 3400 cm^{-1} . A absorção nessa região está atribuída a estiramentos C-H, 30 O-H e N-H e o alargamento sugere o aumento das interações do tipo ligações de hidrogênio. Assim, pode-se inferir que houve interação por ligações de hidrogênio entre os componentes do extrato e o polímero.

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. As micrografias eletrônicas de varredura obtidas para as nanopartículas sem e com o extrato estão apresentadas nas figuras 2 e 3, respectivamente. Para a formulação sem o extrato (“branca”), é possível observar a formação de partículas esféricas com cerca de 50 nm, aglomeradas na forma de cachos arredondados. Essa aglomeração está relacionada à secagem do material para análise. Já para a formulação contendo o extrato, foi possível observar a formação de nanopartículas esféricas com cerca de 100 nm, também aglomeradas na forma de cachos. A incorporação do extrato levou a um aumento substancial no tamanho das partículas. Ao mesmo tempo, não foi possível observar irregularidades na superfície das nanopartículas, sugerindo uma interação física entre o extrato e o polímero.

O tamanho das partículas também foi medido por espalhamento dinâmico da luz, que é uma técnica mais rápida para avaliação de tamanho. O objetivo da realização das duas medidas foi avaliar se essa técnica poderia ser utilizada na prática durante o desenvolvimento das formulações. Os resultados obtidos para a formulação “branca” indicaram que as partículas obtidas apresentavam tamanho médio de 275 nm e índice de polidispersão de 0,649. Já para as partículas contendo o extrato, o tamanho médio encontrado foi de 223 nm e o índice de polidispersão foi de 0,484.

A técnica de espalhamento de luz apenas estima o tamanho das partículas por meio da avaliação dos coeficientes de translação e difusão das partículas. Paralelamente, foi observado na microscopia eletrônica de varredura que as partículas apresentavam algum grau de agregação, que foi maior para as nanopartículas “brancas” e, menor para as nanopartículas contendo o extrato. Assim, pode-se inferir que este estado de agregação afetou os coeficientes de difusão e translação das partículas e influenciou nas medidas de tamanho. Por isso, o tamanho das partículas “brancas”, encontrados, foi muito maior e muito mais disperso em relação ao que foi observado nas micrografias eletrônicas de varredura. Esse estado de agregação também afetou, mesmo que em menor escala a avaliação do

tamanho das nanopartículas contendo o extrato. Dessa forma, é possível dizer que o método de avaliação de tamanho por espalhamento de luz não foi adequado para a mensuração do tamanho das nanopartículas obtidas nesse trabalho.

5 A concentração de extrato padronizado de *S. obovatum* na formulação final (suspensão nanoparticulada) foi de $54,615 \pm 0,252 \mu\text{g/mL}$. Considerando que foram adicionados $142,857 \mu\text{g/mL}$ de extrato para a produção da formulação, pode-se dizer que 38,231% do extrato foram convenientemente incorporados à formulação na forma de extrato encapsulado e na forma de
10 extrato solúvel. Esse teor de incorporação está relacionado às perdas de extrato nas diversas etapas do processo produtivo.

O resultado obtido para o primeiro teste de liberação procedido com a formulação está apresentado na figura 4. Como pode ser observado, após 960 min, somente cerca de 20% do extrato presente na formulação foi liberado. Por
15 isso, o teste foi repetido em um intervalo maior de tempo (doze dias), e o resultado obtido está representado na figura 5. É possível perceber que cerca de 30% do extrato foi liberado após 7 dias de incubação e que, a partir daí, não houve mais liberação de material. Assim, pode-se concluir que interação entre o fármaco e o extrato foi forte o suficiente para permitir a liberação prolongada
20 de cerca de 30% do extrato durante sete dias.

A liberação do fármaco foi mais lenta do que a encontrada para o princípio ativo quercitrina de nanopartículas de PLA (90% em 200 horas) (KUMARI, A. et al. Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v 82, p. 224–232, 2011) e para genes e drogas a partir de
25 sistemas biodegradáveis de derivados de polifosfatos (80% em 7 dias) (Patente US12016186. Methods for drug delivery of bioactive substances with biodegradable polyphosphates). Aqui é importante considerar que, para doenças crônicas, como a psoríase, cujo tratamento pode envolver até 300
30 sessões de fototerapia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD) Consenso Brasileiro de psoríase, p 57, 2009), uma liberação mais

prolongada como a encontrada para as nanopartículas descritas nesse pedido de patente é muito interessante como alternativa terapêutica.

REIVINDICAÇÕES

1. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, caracterizadas por** compreenderem quitosana, um ácido orgânico ou inorgânico, um poliânion e um extrato vegetal.
- 5 2. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela** concentração de quitosana estar entre 0,1 e 10 mg/mL, preferencialmente entre 1 e 2 mg/mL.
3. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo** quitosana ter grau de
10 desacetilação superior a 75%.
4. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo** ácido ser preferencialmente orgânico.
5. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com as reivindicações 1 e 4, caracterizadas pelo** ácido orgânico ser
15 selecionado do grupo compreendendo ácido acético, ácido cítrico ou ácido ascórbico, preferencialmente o ácido acético.
6. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo** ácido inorgânico ser selecionado
20 do grupo compreendendo ácido clorídrico, ácido fosfórico ou ácido sulfúrico.
7. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com as reivindicações 1, 4, 5 e 6, caracterizadas pela** concentração do ácido orgânico ou inorgânico estar entre 0,5 e 50 mg/mL.
8. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo** poliânion ser o
25 dioctilsulfosuccinato ou o tripolifosfato.
9. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com as reivindicações 1 e 9, caracterizadas pela** concentração do poliânion

estar compreendida entre 0,1 e 10 mg/mL, preferencialmente entre 0,5 e 2 mg/mL.

10. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela** concentração do extrato vegetal
5 **estar compreendida entre 0,1 e 20% do peso de quitosana, preferencialmente entre 5 e 15%.**

11. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com as reivindicações 1 e 10, caracterizadas pelos** extratos vegetais
compreenderem plantas dos gêneros *Stryphnodendron* ou *Dimorphandra*.

10 12. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com a reivindicação 11, caracterizadas pelo** *Stryphnodendron* compreender
as espécies *obovatum*, *adstringens* ou *polyphyllum* e o *Dimorphandra* compreender a espécie *mollis*.

13. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo**
15 **com as reivindicações 1 a 12, caracterizadas por serem produzidas pelo método de gelatinização ionotrópica.**

14. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com as reivindicações 1 a 13, caracterizadas por** apresentarem liberação
controlada do extrato vegetal.

20 15. **Nanopartículas poliméricas para liberação controlada de acordo com a reivindicação 14, caracterizadas pela** liberação do extrato vegetal
compreender um período superior a 14 dias.

16. **Uso das nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com as reivindicações 1 a 15, caracterizado por ser para a**
25 **veiculação tópica do extrato vegetal.**

17. **Uso das nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pela** aplicação ser
preferencialmente tópica.

18. **Uso das nanopartículas poliméricas para liberação controlada, de**
30 **acordo com a reivindicação 17, caracterizado por ser no tratamento de**

patologias cutâneas, preferencialmente, psoríase, queimaduras e/ou dermatites.

FIGURAS

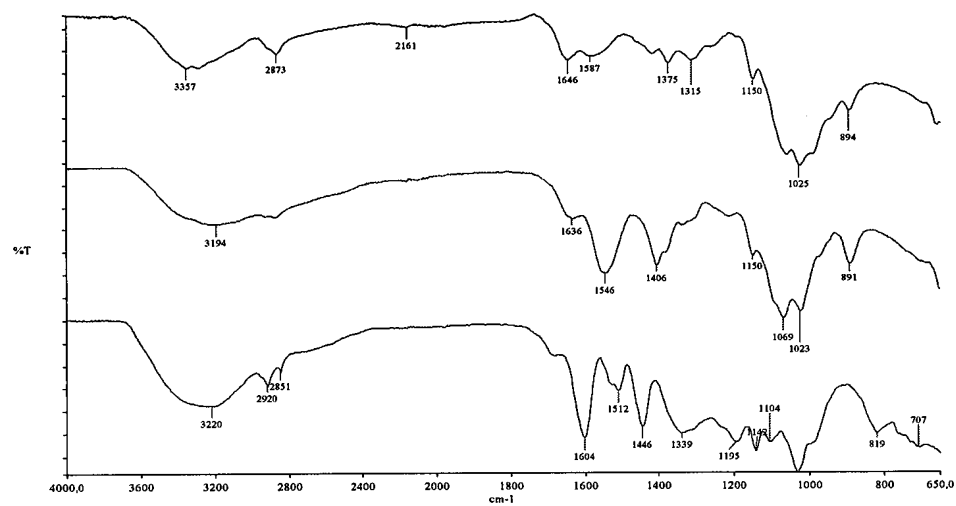
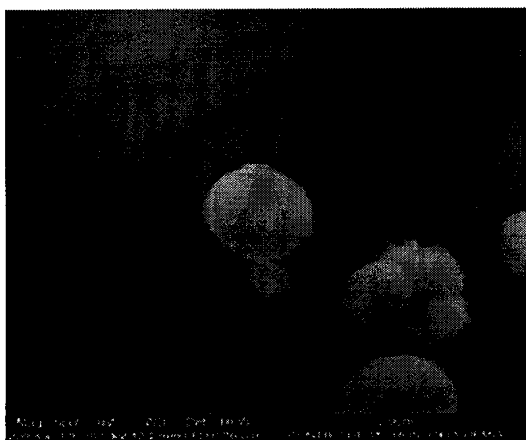
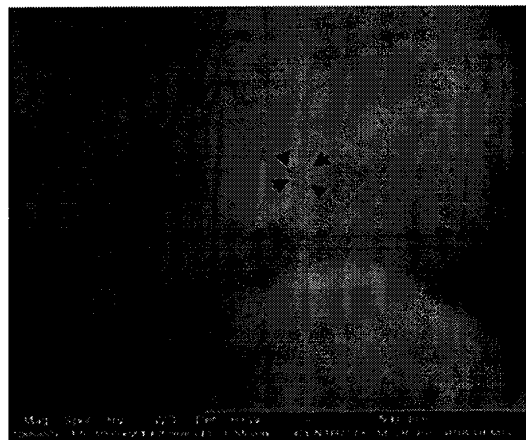


Figura 1



(a)



(b)

Figura 2

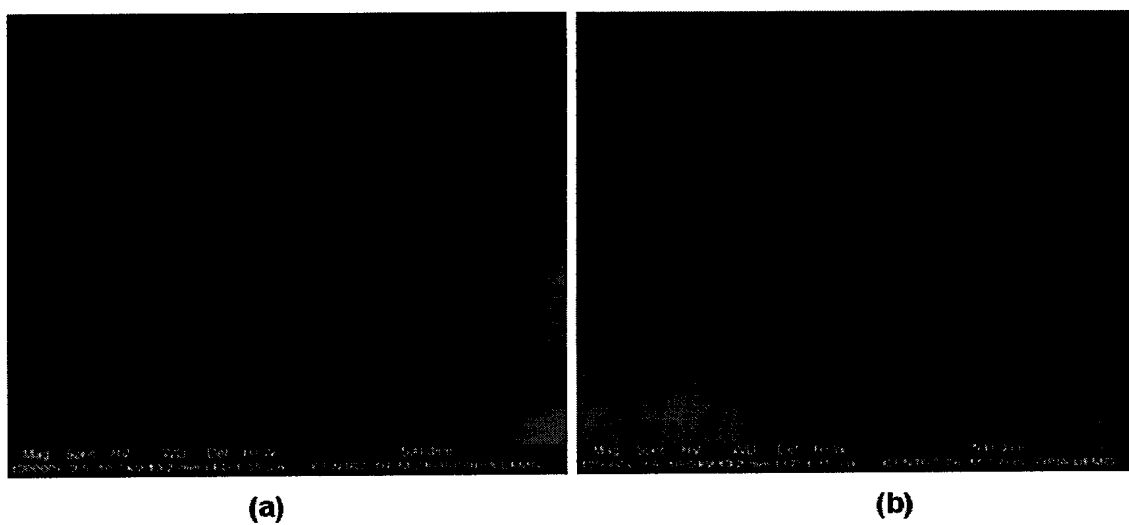


Figura 3

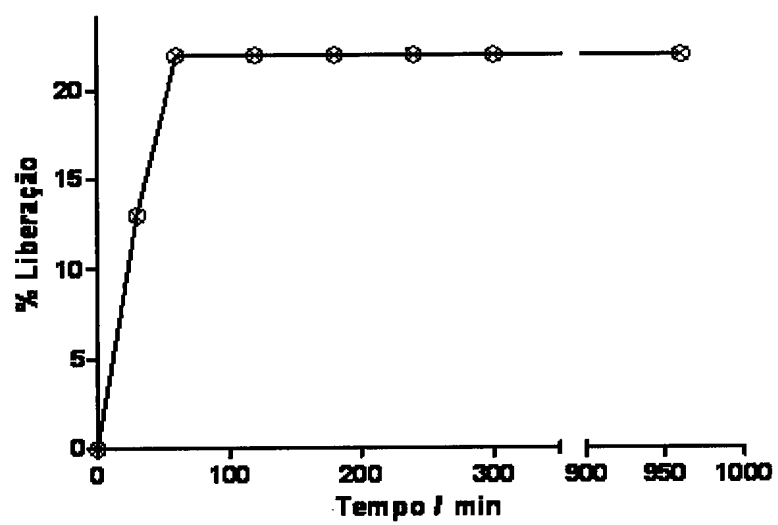


Figura 4

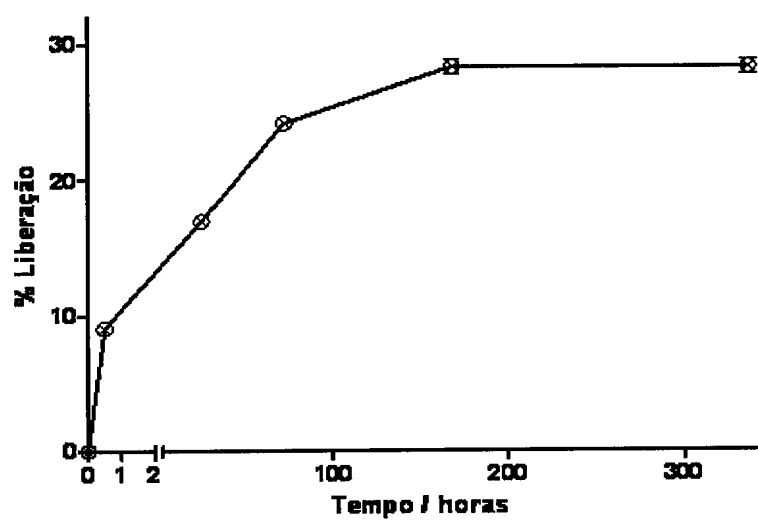


Figura 5

RESUMO

“NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE EXTRATOS VEGETAIS”

5 A matéria tratada descreve formulações farmacêuticas contendo nanopartículas poliméricas capazes de veicular extratos vegetais e suas aplicações. As formulações apresentadas podem ser produzidas a partir do polímero natural quitosana e de seus derivados, podendo ser utilizadas para veiculação tópica (pele e mucosas) controlada de extratos vegetais com atividade terapêutica.