



## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 019855 3

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 3

**Nome ou Razão Social:** INSTITUTO DE TECNOLOGIA E PESQUISA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 02886710000196

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Bairro Farolândia

**Cidade:** Aracaju

**Estado:** SE

**CEP:** 49032-490

**País:** Brasil

**Telefone:** (79) 3218-2190

**Fax:** (79) 3218-2190

**Email:** agitec@itp.org.br

**Depositante 2 de 3**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE TIRADENTES

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 13013263000187

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** AV. MURILO DANTAS, 300, FAROLÂNDIA

**Cidade:** ARACAJU

**Estado:** SE

**CEP:** 49035-490

**País:** BRASIL

**Telefone:** (79) 321 82226

**Fax:**

**Email:** reitoria@unit.br

**Depositante 3 de 3**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA " JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 48031918000477

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Quirino de Andrade, 215, CENTRO

**Cidade:** SÃO PAULO

**Estado:** SP

**CEP:** 01049-010

**País:** BRASIL

**Telefone:** (11) 562 70233

**Fax:**

**Email:** vergani@reitoria.unesp.br

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA

**Resumo:** A presente patente de invenção (PI) diz respeito a um processo de obtenção de nano e micropartículas encapsulando 4-metilesculetina (4-ME) e avaliação no tratamento da doença inflamatória intestinal. Assim, o dito processo pode ser categorizado como um produto farmacêutico e/ou farmacologicamente ativo tendo em vista que se trata de um processo de obtenção de nano/micropartículas poliméricas preferencialmente utilizando a quitosana como polímero, e, diante disso possui aplicação direta nas áreas de farmácia, medicina, biomedicina, química e biotecnologia. Ainda, esta invenção descreve a encapsulação do princípio ativo 4-ME nas nano/micropartículas para tratamento preferencial de doença inflamatória intestinal. Para desenvolvimento do dito processo de obtenção de nano/micropartículas poliméricas empregando quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio pelo método de gelificação ionotrópica, bem como as nano/micropartículas obtidas, as seguintes etapas de 1 e 2 devem ser consideradas: (1) preparo da solução de quitosana e tripolifosfato de sódio separadamente e (2) gelificação ionotrópica. Por fim, evidencia-se que o nano/microencapsulamento da 4-ME com polímeros adequados visa um melhor direcionamento e liberação do ativo no tecido alvo, e conseqüentemente, aumenta a sua biodisponibilidade e efeito terapêutico. Além disso, o produto final pode ser um ingrediente ativo para novas formulações farmacêuticas.

**Figura a publicar:** F1

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 5

**Nome:** PATRÍCIA SEVERINO

**CPF:** 22357108835

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Av. Senador Julio Cesar Leite, 1445. BI01 apto403

**Cidade:** ARACAJU

**Estado:** SE

**CEP:** 49037-580

**País:** BRASIL

**Telefone:** (79) 999 988910

**Fax:**

**Email:** patricia\_severino@itp.org.br

### Inventor 2 de 5

**Nome:** DANIELE MARTINS DE LIMA

**CPF:** 96995270568

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação

**Endereço:** Avenida Murilo Dantas 1409

**Cidade:** ARACAJU

**Estado:** SE

**CEP:** 49032-490

**País:** BRASIL

**Telefone:** (79) 991 919110

**Fax:**

**Email:** danilima.lipe@gmail.com

### Inventor 3 de 5

**Nome:** LUCIANA NALONE ANDRADE

**CPF:** 83604111587

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação

**Endereço:** Rua Engenheiro Jorge de Oliveira Neto, 935. Coroa do Meio.

**Cidade:** ARACAJU

**Estado:** SE

**CEP:** 49035-300

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:** Luciana.nalone@hotmail.com

**Inventor 4 de 5**

**Nome:** LUIZ CLAUDIO DI STASI

**CPF:** 07628126804

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Distrito de Rubião Junior, Campus de Botucatu, Instituto de Biociências (IBB)

**Cidade:** BOTUCATU

**Estado:** SP

**CEP:** 18618-970

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:** distasilc@gmail.com

**Inventor 5 de 5**

**Nome:** FABIANA MASAGO

**CPF:** 34512479848

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Rua olavo bilac, 9-17

**Cidade:** Bauru

**Estado:** SP

**CEP:** 17060-454

**País:** BRASIL

**Telefone:** (14) 323 27893

**Fax:**

**Email:**

### Documentos anexados

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Comprovante de pagamento de GRU 200	DEPÓSITO.pdf
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Desenho	FIGURAS.pdf
Procuração	PROCURAÇÃO UNESP.pdf
Procuração	PROCURAÇÃO UNIT.pdf
NOMEAÇÃO REITOR UNESP	nomeacao-do-reitor-da-unesp.pdf
ATA DE NOMEAÇÃO ITP	ATA DE PRESIDENCIA DIEGO.PDF
Contrato Social	Contrato Social UNIT.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf

### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

## **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA E PRODUTO OBTIDO**

### **BREVE APRESENTAÇÃO**

[001] A presente patente de invenção (PI) diz respeito a um inédito processo para obtenção de nano e micropartículas de quitosana contendo a 4-metilesculetina (4-ME) para o tratamento da inflamação intestinal. Assim, a proposta principal deste documento é revelar de forma detalhada e reivindicar proteção para o processo de desenvolvimento de nano e micropartículas com liberação específica de fármacos no cólon, empregando a quitosana, um polímero natural derivado da quitina. A quitosana é aplicada como carreador em nano e micropartículas por apresentar propriedades biológicas favoráveis, sendo atóxica, biocompatível e biodegradável. Nesse contexto, com base na interessante atividade anti-inflamatória intestinal de 4-ME, o presente estudo desenvolveu formulações com a incorporação da 4-ME em nano e micropartículas, permitindo dessa forma uma liberação específica e por maior tempo no cólon, potencializando sua atividade anti-inflamatória. Assim, as nano e micropartículas podem ser interessantes estratégias terapêuticas para potencializar e/ou prolongar a atividade anti-inflamatória da 4-ME, tanto no processo inflamatório intestinal, como também em outras doenças inflamatórias.

[002] É importante frisar que além da vantagem mencionada, e dentre outras, a presente invenção permite que ocorra um aumento no tempo de retenção da 4-ME através da incorporação dessa substância em nano e micropartículas de quitosana. Além disso, pelo fato de possuírem propriedades mucoadesiva e degradação por bactérias do cólon, melhorar a solubilidade e taxa de dissolução do fármaco em água, com conseqüente aumento no seu potencial terapêutico.

[003] Por fim, mais especificamente, a presente invenção refere-se à aplicação do polímero quitosana, objetivando o aumento no tempo de permanência do fármaco no cólon e avaliar a resposta anti-inflamatória intestinal da 4-ME em comparação à sua administração na forma livre. Em relação ao atual problema existente no estado da técnica, ressalta-se que apesar de a 4-ME ser o fármaco mais indicado para o tratamento da retocolite ulcerativa e a Doença de Crohn, que constituem a Doença Inflamatória Intestinal (DII), este fármaco apresenta

algumas características que limitam seu uso, como por exemplo, baixa solubilidade em água (aproximadamente 0,4 mg/mL), resultando em biodisponibilidade errática. Assim, a invenção aqui proposta visa solucionar este problema por meio da aplicação do polímero quitosana como um material adequado e com eficiência significativa para aumentar o tempo de retenção e biodisponibilidade da 4-ME, contribuindo assim para o aumento da eficiência terapêutica, visto que os tratamentos atuais não promovem a cura definitiva e podem causar diversos efeitos colaterais nos indivíduos com DII.

### **CAMPO DE APLICAÇÃO**

[004] A presente invenção refere-se a um produto farmacêutico e/ou farmacologicamente ativo mais especificamente a um fármaco, 4-ME, encapsulada por meio de nano e micropartículas poliméricas, e, diante disso possui aplicação direta nas áreas de farmácia, medicina, biomedicina, química e biotecnologia. Pode ainda ser categorizada como processo e produto com aplicação na área de nano e microtecnologia, através da disponibilização de processo de obtenção de micropartículas polimérica por gelificação ionotrópica, utilizando quitosana e tripolifosfato de sódio, bem como as nano/micropartículas obtidas, tendo como público alvo indivíduos/pacientes acometidos com doença inflamatória intestinal.

### **FUNDAMENTOS DA TÉCNICA**

[005] A DII abrange duas formas graves de inflamações crônicas, idiopáticas e recidivantes do trato gastrointestinal, a retocolite ulcerativa e a Doença de Crohn [FUSUNYAN, R.D. & SANDERSON, I.R. Inflammatory bowel disease. *Encyclop of Immunol*, v.3, n.2,p.1375-1381, 1998; SANCHEZ-MUÑOS, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, v.14, n. 27, p.4280-4288, 2008].

[006] Entretanto, as duas doenças se diferem quanto a algumas características. Na retocolite ulcerativa (RCU), a inflamação se limita ao cólon onde acomete as camadas mucosa e submucosa e não há ocorrência de fístulas e nem de granulomas. Em contraste, a inflamação na Doença de Crohn (DC) pode ocorrer em qualquer órgão do trato gastrointestinal, comprometer todas as camadas do



mesmo e ocorrer a formação de fístulas e granulomas [BUDARF, M.L.; LABBE´, C.; GENEVIÈVE, D.; RIOUX J.D. GWA studies: rewriting the story of IBD. **Trends in Genet**, v.25, n.3, p.137-146, 2009 e KHOR, B.; GARDET A.; XAVIER R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, ed.474, v.7351, p.307–317, 2011].

[007] Contudo, os principais problemas relacionados com a DII são as recidivas e a exacerbação dos sintomas como dores abdominais, diarreia, alterações das funções intestinais, hemorragia retal [MOUM, B.; EKBOM, A.; VATN, M.H.; AADLAND, E.; SAUAR, J.; LYGREN, I. Clinical course during the 1st year after diagnosis in ulcerative colitis and Crohn's disease. Results of a large, prospective population-based study in southeastern Norway, 1990–93. **Scand J Gastroenterol**, v.32, p.1005–12, 1997 e CAPRILLI, R.; LATELLA, G.; FRIERI, G. Treatment of inflammatory bowel diseases: to heal the wound or to heal the sick? **J Crhns Colitis**, v.6, p.621–625, 2012], náusea, perda de peso, perda de apetite e taquicardia [KAWADKAR, J.; RAM, A. Colon target chitosan microsphere compressed matrices for the treatment of ulcerative colitis. **Pharm Rev**, v.5, 2007].

[008] Considerando-se que estes sintomas afetam aproximadamente metade dos doentes, os quais apresentam a remissão dos sintomas com ocorrência de recidivas a qualquer momento, sendo que em 90 % dos casos o ciclo é intermitente, a DII torna-se um problema preocupante, pois seus problemas acabam afetando a qualidade de vida do indivíduo [BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Gastroenterology**, v.369, p.1641-1657, 2007].

[009] Apesar da incidência no mundo da DII ser considerada baixa, variando de 3,1 a 20,2 pessoas a cada 100.000 habitantes para a DC e de 2,2 a 19,2 pessoas por 100.000 habitantes para a RCU (NEURATH, 2014) e dos registros da epidemiologia no Brasil serem escassos, sendo relatada a incidência de 5,65 pessoas por 100.000 habitantes para a DC e de 14,81 pessoas por 100.000 habitantes para a RCU no sudeste do Brasil (VICTORIA *et al.*, 2009) e de 1,53 pessoas por 100.000 habitantes para as duas doenças na região do Piauí (PARENTE, 2015). Os gastos terapêuticos relacionados com a DII não refletem

esta baixa incidência, em 2012 os valores gastos no tratamento da doença foram de 5,1 bilhões de dólares e estima-se que chegarão a 6,2 bilhões de dólares em 2017 de acordo com dados da BCC Research (Business Communications Company Research).

[0010] Ainda que a etiologia da DII esteja sendo amplamente estudada nas últimas décadas, as suas causas ainda não estão totalmente elucidadas [MOLODECKY, N.A.; SOON, I.S.; RABI, D.M.; GHALI, W.A.; FERRIS, M.; CHERNOFF G.; BENCHIMOL, E.I.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; BARKEMA, H.W.; KAPLAN, G.G. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v.142, p.46–54, 2012]. Porém, sugere-se que o processo inflamatório na DII seja resultante da combinação de predisposições genéticas associadas a alterações do sistema imune e a fatores ambientais, como tabagismo, estresse, uso de anticoncepcional e má alimentação, que promovem uma disfunção da barreira intestinal, o que pode resultar no desenvolvimento do processo inflamatório intestinal.

[0011] Desta maneira, a alteração da estrutura e/ou função da microbiota, além da falha na regulação do sistema imune e da liberação excessiva de EROs, podem modificar a homeostase intestinal alterando a permeabilidade vascular [KHOR, B.; GARDET A.; XAVIER R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, ed.474, v.7351, p.307–317, 2011], e conseqüentemente, aumentando o influxo de macrófagos e neutrófilos para o local inflamado que aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas (IL) 4, 10 e 11 e das citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e as IL-1, IL-6 e IL-12.

[0012] Considerando todos os desconfortos causados pela DII citados, como as dores abdominais, diarreia, alterações das funções intestinais, hemorragia retal náusea, perda de peso, perda de apetite e taquicardia, além das constantes recidivas da doença e da exacerbação desses sintomas associados aos altos custos gastos no tratamento da doença, a procura de novas alternativas se torna essencial.

[0013] A incompreensão das causas da DII dificulta sua terapêutica; os objetivos dos medicamentos convencionais são diversos: tratamento dos sintomas, prevenção de recidivas (tratamento de manutenção), cicatrização de fístulas e evitar cirurgias de urgência. Nenhum fármaco isolado é eficaz para tratar todos esses objetivos, até o presente momento os pacientes dependem da aplicação de múltiplos medicamentos ao longo da vida [COLLNOT, E.M.; HUSSAIN, A.; CLAUS-MICHAEL, L. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **J Control Release**, v.161, p.235-246, 2012].

[0014] A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento da DII inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos (sulfassalazina, olsalazina), glicocorticoides (prednisolona, prednisona) e imunossupressores (azatioprina, 6-mercaptopurina) e a terapia biológica, tais como anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  (infliximab, adalimumab). Infelizmente, a terapêutica disponível não representa a cura para a DII, sendo que os fármacos disponíveis possuem sérios efeitos colaterais, além de apresentarem um custo elevado, como é o caso da terapia biológica.

[0015] Neste contexto fica clara a necessidade da busca de novas estratégias terapêuticas ou ainda de novos compostos que possam potencializar o efeito dos fármacos, diminuir a dose administrada e conseqüentemente o risco da ocorrência de efeitos colaterais [VISCIDO, A.; CAPANNOLO, A.; LATELLA, G.; CAPRILLI, R.; FRIERI, G. Nanotechnology in the treatment of inflammatory bowel diseases. **J Crohns Colitis**, 2014].

[0016] Com base nisto, iniciou-se um estudo para avaliar a atividade anti-inflamatória intestinal de 4-ME no modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS em ratos e observou-se que este composto apresentou atividade na dose de 5 mg/Kg, e essa atividade foi associada às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias desta substância [WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid modelo of rat colitis. **Chem-Biol Interact**, v.186, p. 211-218, 2010].

[0017] Devido a estes interessantes resultados, novos estudos foram realizados e demonstraram que a atividade anti-inflamatória intestinal de 4-ME está

relacionada com a redução dos níveis de IL-1 $\beta$ , inibição da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), fosfatase alcalina (FA) e metaloproteinase-9 (MMP-9) e pela atividade antioxidante do composto, observada pela diminuição nos níveis de malonaldeído (MDA) e por evitar a depleção do conteúdo de glutathiona total (GSH) colônico. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a 4-metilesculetina promove a inibição de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-2 e IFN- $\gamma$  em culturas de células RAW 264.7, Caco-2 e esplenócitos, respectivamente (WITAICENIS *et al.*, 2012).

[0018] A liberação controlada, importante característica das nano e micropartículas, evita tais oscilações mantendo a concentração efetiva, diminuindo o número de doses e levando a uma maior probabilidade de sucesso terapêutico por período de tempo prolongado. Ademais, as nano e micropartículas podem proteger os compostos sensíveis aos diversos ambientes e direcionar de maneira específica o fármaco para os locais de ação desejados aumentando a eficiência de ação de substâncias ativas. Isso minimiza os custos gastos com profissionais de saúde para administrar o fármaco e aumenta a conveniência em relação à administração diurna e noturna do medicamento para os pacientes.

[0019] Com base no exposto, para o desenvolvimento de nano e micropartículas com liberação específica de fármacos no cólon, tem sido amplamente utilizada a quitosana. A quitosana é um polímero natural derivado da quitina, formada por copolímeros  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-amino 2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) - 2-acetamida 2-desoxi-D-glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário. É aplicada como carreador em nano e micropartículas por apresentar propriedades biológicas favoráveis, sendo atóxica, biocompatível, biodegradável [KOSARAJU, S.L. Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, ed.4, p.251-258, 2005]. Outras propriedades positivas são: ação antimicrobiana, absorção de metais tóxicos (mercúrio, cádmio e chumbo) e a capacidade de estimular o sistema imune.

[0020] Além disso, a quitosana é degradada por enzimas produzidas por bactérias anaeróbias, do gênero *Bacteroides* e *Bifidobacterium* da microbiota

colônica que são responsáveis pela hidrólise glicosídica desse polissacarídeo, assim, a utilização da quitosana no desenvolvimento das nano e micropartículas neste trabalho por proporcionar uma liberação específica e eficaz no cólon.

### **LITERATURA TÉCNICA ESPECIALIZADA**

[0021] A literatura técnica especializada revela alguns documentos de patentes que fazem referência a preparações/composições/compostos farmacêuticos (as) com base de quitosana e 4-metilesculetina, como por exemplo, os pedidos **PI 1104669-4**, **PI 0608635-7**, **PI 0518093-7**. Assim, e, para embasar o critério de novidade e atividade inventiva foi realizada uma pesquisa na base de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) que compila o acervo de patentes depositadas do Brasil, e na base europeia de Patentes (Espacenet) que compila o acervo de patentes depositadas em mais de 90 países. Na pesquisa realizada não foi identificada nenhum documento de patente que faz referência ao processo de nano e microencapsulação da 4-ME utilizando a técnica de gelificação ionotrópica empregando quitosana e tripolifosfato de sódio empregados nesta invenção.

[0022] Os documentos de maior relevância serão descritos a seguir, entretanto, é importante deixar claro que nenhum deles fere o quesito de novidade da patente de invenção requerida nesse documento.

[0023] O documento brasileiro **PI 1104669-4 A2**: A matéria tratada descreve formulações farmacêuticas contendo nano partículas poliméricas capazes de veicular extrato 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. Apesar de utilizar o mesmo polímero (quitosana) para produção das nanopartículas, essa patente emprega a encapsulação de produtos naturais e para uso tópico, é importante deixar claro que para o produto final foi realizado uma metodologia diferente de produção, empregada para uso oral e emprega o fármaco 4-metilesculetina, diferem consideravelmente do que é solicitado nesta invenção. Diante disso, e, em hipótese alguma, deve ser considerado como documento limitante do estado da técnica.

[0024] O documento brasileiro **PI 0608635-7** descreve um sistema nanoparticulado para a liberação de moléculas biologicamente ativas compreendendo polímero quitosana ou seus derivados, modificado quimicamente com polietilenoglicol e reticulado com um agente de reticulação. Estes sistemas são especialmente úteis para composições farmacêuticas, vacinas e formulações cosméticas. Apesar de utilizar o mesmo polímero, o mesmo empregou quitosana modificada com polietilenoglicol e foi empregada para uso cosmético. Diante disso, e, em hipótese alguma, deve ser considerado como documento limitante do estado da técnica.

[0025] O documento brasileiro **PI 0518093-7** apresenta nanopartículas compostas de quitosana, de ácido poli- $\gamma$ -glutâmico, e pelo menos um agente bioativo caracterizado com uma carga de superfície positiva e a sua permeabilidade intensificada para a distribuição para celular do fármaco. Apesar de utilizar o mesmo polímero quitosana, o mesmo foi reticulado com poli-glutâmico e é empregado para administração de proteínas. A invenção revelada difere consideravelmente do que é solicitado proteção neste documento de patente, pois envolve o método de preparação e produto final distintos, portanto, não pode ser considerado como limitante para a solicitação de exclusividade do que é proposto neste documento de patente.

[0026] Ampliando o escopo da pesquisa, identificaram-se alguns documentos de patentes que fazem referência a preparações/composições/compostos farmacêuticos(as) para tratamento de Doenças Inflamatórias Intestinais.

[0027] O documento brasileiro **PI 9608785-4** descreve um produto para inflamação intestinal, especialmente doença de Crohn e colite ulcerativa que são tratadas por meio de administração de uma forma de dosagem oral contendo como um princípio ativo um ácido ômega-3-poli insaturado na forma de ácido livre ou como um seu sal farmacêuticamente aceitável, a qual libera o ácido dentro do íleo. De preferência, a forma de dosagem oral é uma capsula de gelatina revestida com um poli(acrilato de etila - metacrilato de metila). Apesar da doença ser a mesma na patentes, a tecnologia e o princípio ativo utilizado foi ácido ômega-3-poli insaturado diferente da proposta de forma considerável, e, por isso não pode ser considerado como um documento limitante do estado da técnica.

[026] O documento de patente brasileiro **PI11056762** revela um método para tratar doença intestinal inflamatória ou síndrome de intestino irritável e uma composição farmacêutica oral. As composições permitem liberação controlada e mascaramento do sabor contendo um ou mais princípios ativos compreendidos em uma estrutura matriz de três componentes, isto é, uma estrutura formada por sucessivas matrizes anfífilas, liofílicas ou inertes e, finalmente, compreendidos ou dispersos em matrizes hidrofílicas. O processo em questão aborda a encapsulação de um componente ativo por meio de matrizes com diferentes propriedades e tem sua aplicação voltada para o tratamento de doenças intestinais inflamatórias, entretanto, é importante deixar claro que o componente farmacologicamente ativo e as etapas de preparação para a obtenção do produto final, bem como, o próprio produto final, diferem consideravelmente do que é solicitado nesta invenção. Diante disso, e, em hipótese alguma, deve ser considerado como documento limitante do estado da técnica.

[027] O documento de patente americano **US61327368** descreve um método para prevenção e/ou tratamento de certas doenças gastrointestinais, tais como as Doenças de Johne em animais e Doença de Crohn em seres humanos. O método revelado envolve a administração de certas bactérias probióticas, tais como bactérias produtoras de ácido láctico, as quais auxiliam a inibir a infecção por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), que é o agente patogênico primário suspeito de causar várias doenças intestinais inflamatórias em gado ou seres humanos. Apesar de a invenção referir-se ao tratamento de doenças intestinais inflamatórias por meio da aplicação de um agente terapêutico, o conceito inventivo difere de forma considerável da presente invenção, e, por isso, não deve ser considerado como documento limitante do estado da técnica.

[0028] Diante do apresentado, ressalta-se que o desenvolvimento e aplicação da invenção aqui proposta neste documento de patente de invenção, intitulada PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA E PRODUTO OBTIDO, possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico compreendido no estado da técnica possui a tecnologia de desenvolvimento, obtenção e aplicação semelhantes. Destaca-se ainda que a tecnologia proposta neste documento de patente de invenção apresenta também

os outros critérios de patenteabilidade, como atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

### **VANTAGENS DA INVENÇÃO**

[0029] Em relação às vantagens e diferenciais apresentados pelo dito **‘PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA’**, pode-se destacar como mais relevantes:

[0030] Importância no desenvolvimento e aplicação tecnológica de nano e micropartículas poliméricas com 4-ME encapsulada que apresenta como diferenciais características de biocompatibilidade e baixa toxicidade.

[0031] O nano/microencapsulamento da 4-ME com quitosana permitem um melhor direcionamento e liberação do fármaco no tecido alvo, e conseqüentemente, aumenta a sua biodisponibilidade e efeito terapêutico.

[0032] Processo que compreende matérias primas versáteis, associada ao baixo custo e processo simplificado.

[0033] As matérias primas utilizadas são compatíveis fisiologicamente devido à semelhança com a estrutura das membranas celulares, que são compostas de fosfolípidios, facilitando a adesão e penetração na célula ou tecido alvo.

[0034] O desenvolvimento de nano/micropartículas poliméricas representa uma alternativa as formas farmacêuticas da 4-ME já existentes no mercado e com maior eficiência terapêutica e menor efeitos indesejáveis, e, além disso, o produto final pode ser um ingrediente ativo para novas formulações farmacêuticas.

[0035] O processo de obtenção é prático, seguro, e, pode ser aplicado em escala industrial.

[0036] Após as vantagens apresentadas e para que o processo da invenção proposta nesse documento de patente possa ser mais bem compreendido e avaliado, a descrição dos desenhos será feita a seguir.

### **DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**



[0037] A invenção será, a seguir, explicada em seus detalhes, sendo que, a título ilustrativo, são apresentados os seguintes desenhos.

[0038] A Figura 1 representa a Micrografia das nano e micropartículas por MEV. As setas vermelhas indicam as micropartículas e as setas azuis, as nanopartículas. (A) e (B) Micropartícula Vazia (sem 4-ME) em aumento de 3.000x e 6.000x, respectivamente; (C) e (D) Micropartículas com 4-ME em aumento de 53.000x e 6.000x, respectivamente; (E) Nanopartículas Vazias em aumento de 4.000x; (F) Nanopartículas com 4-ME em aumento de 4.000x.

[0039] A Figura 2 compara a mucoadesão entre as partículas. (a) Estimativa da interação entre nanopartículas, com e sem 4-ME, e mucina por teste de turbidez (n=3). (b) Estimativa da interação entre micropartículas, com e sem 4-ME, e mucina por teste de turbidez (n=3); dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. e analisados por ANOVA *a posteriori* Dunnet com \*p<0,01 significativo.

[0040] Figura 3 demonstra a liberação *in vitro* das partículas em três diferentes fluidos de simulação; (a) Avaliação da liberação *in vitro* das nanopartículas com 0,8 mg/mL de 4-ME (n=3); (b) Avaliação da liberação das micropartículas com 1,5 mg/mL de 4-ME (n=3).

[0041] Figura 4 revela de forma ilustrativa, e em hipótese alguma de forma limitante, todas as etapas do processo de obtenção de nano/micropartículas polimérica desta invenção, as quais foram obtidas por meio do processo que compreende as etapas de: (1) preparo da solução e (2) Gelificação ionotrópica.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[0042] O objeto principal deste pedido de patente de invenção é descrever com detalhes o processo e o produto relacionado ao **‘PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA’**. Assim, mais especificamente, a invenção aqui revelada se refere a um processo de obtenção de nano/micropartículas polimérica preferencialmente com quitosana, bem como as nano/micropartículas obtidas. Ainda, e de forma mais detalhada, esta invenção descreve a encapsulação do fármaco 4-ME nas nano/micropartículas especificamente e preferencialmente para tratamento de doença inflamatória intestinal. O desenvolvimento de

nano/micropartículas polimérica representa uma nova formulação da 4-ME para comercialização no mercado e que evite efeitos colaterais indesejáveis.

[0043] Destaca-se que o processo e produto aqui desenvolvidos possui aplicação na área de nano e microtecnologia, através da disponibilização de processo de obtenção de nano/micropartículas poliméricas por gelificação ionotrópica, utilizando quitosana e tripolifosfato de sódio, bem como as nano/micropartículas obtidas, tendo como público alvo indivíduos/pacientes acometidos com doença inflamatória intestinal. Além disso, o produto final pode ser um ingrediente ativo para novas formulações farmacêuticas. Assim, vale ressaltar a importância no desenvolvimento e aplicação tecnológica de nano/micropartículas poliméricas com 4-ME encapsulada que apresenta como diferenciais características de biocompatibilidade e baixa toxicidade. Por fim, evidencia-se que o nano/microencapsulamento da 4-ME com quitosana e tripolifosfato de sódio permite um melhor direcionamento e liberação do fármaco no tecido alvo, e conseqüentemente, aumenta a sua biodisponibilidade e efeito terapêutico.

[0044] Dentro do contexto apresentado, e, para que o processo desenvolvido e produto obtido, objeto de proteção desse pedido de patente, possam ser compreendidos e avaliados de forma mais clara e objetiva, sua descrição detalhada será feita a seguir.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0045] Nesta seção serão revelados todos os detalhes do processo de desenvolvimento do dito **'PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA'**, cujo intuito é o de descrever suficiente e clara, todas as etapas que envolvem o processo de obtenção das ditas nano/micropartículas, e dessa forma, embasar a suficiência descritiva desta invenção.

[0046] Para a produção das nano/micropartículas foram empregadas as seguintes matérias primas ácido acético 0,75% a 2% (v/v), quitosana 0,1 a 2% (m/v), tripolifosfato de sódio 0,03 a 1% (m/v) e 4-ME 0,03% (m/v) a 2,0 mg/mL.

[0047] Para desenvolvimento do dito processo de obtenção de micropartículas poliméricas encapsulando 4-ME por gelificação inotrópica, bem como as micropartículas obtidas, as seguintes etapas de 1 e 2 devem ser consideradas:

[0048] Etapa 1 → Preparo das soluções

[0049] As micropartículas poliméricas da invenção compreendem: preparo de duas soluções denominadas (A) e (B). A solução (A) produzida com ácido acético 0,75% a 2% (v/v) e quitosana 0,1 a 2% (m/v) em quantidade de água desejada, foi mantida sob agitação magnética de 12 a 24 horas à temperatura de 25 °C. Para o preparo das outras micropartículas foi empregado 3 concentrações de 4-ME na solução de TPP, sendo 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL de 4-ME.

[0050] Etapa 2 → Gelificação ionotrópica

[0051] A solução (A) essa solução foi mantida sob agitação magnética de 12 a 24 horas à temperatura de 25 °C. Após as 24 horas o pH foi ajustado para 4,8 – 6,0. As micropartículas poliméricas foram preparadas através da técnica de gelificação ionotrópica. Após o preparo das soluções, a Solução (B) foi adicionada gota a gota na Solução (A) mantendo agitação mecânica de 10 a 30 min.

[0052] Para desenvolvimento do dito processo de obtenção de **nanopartículas** poliméricas encapsulando 4-ME por gelificação inotrópica, bem como as nanopartículas obtidas, as seguintes etapas de 1 e 2 devem ser consideradas:

[0053] Etapa 1 → Preparo das soluções

[0054] As nanopartículas da invenção compreendem: preparo de duas soluções denominadas (A) e (B). A solução (A) produzida com ácido acético 0,75 % (v/v) e quitosana 0,1 % (m/v) em quantidade de água desejada, foi mantida sob agitação magnética por 24 horas à temperatura de 25 °C. Para o preparo das outras micropartículas foi empregado 3 concentrações de 4-ME na solução de TPP, sendo 0,33 mg/mL, 0,53 mg/mL e 0,8 mg/mL de 4-ME.

[0055] Etapa 2 → Gelificação ionotrópica

[0056] A solução (A) essa solução foi mantida sob agitação magnética de 12 a 24 horas à temperatura de 25 °C. Após o tempo avaliado o pH foi ajustado para 5,0-6,5. As nanopartículas poliméricas foram preparadas através da técnica de gelificação ionotrópica. Após o preparo das soluções, a Solução (B) foi adicionada gota a gota na Solução (A) mantendo agitação mecânica por 10-30 min.

[0057] Para concretização da invenção, e para evidenciar a eficiência do processo desenvolvido, as nano/micropartículas poliméricas com 4-ME foram caracterizadas por técnicas físico-químicas.

[0058] Caracterizações foram realizadas tamanho, polidispersividade, potencial zeta, eficiência de incorporação, teste de mucoadesividade, teste de liberação *in vitro* e rendimento.

[0059] As micropartículas foram obtidas com a adição de tripolifosfato de sódio e obtivemos tamanho de aproximadamente 3 a 5 µm conforme mostrado na Tabela 1 abaixo:

**Tabela 1** – Caracterização das micropartículas.

	Tamanho	PDI	ζ (mV)	EI (%)
Micropartículas(µm)				
Vazia	5,119±1,823	0,235±0,155	+8,23±0,207	-----
1 mg/mL	-----	0,341±0,208	+6,02±0.172	93,056
1,5 mg/mL	4,524±1,197	0,244±0,171	+5,23±0,894	96,503
2 mg/mL	-----	0,601±0,490	+4,4±0,252	96,526

Os dados da caracterização das micropartículas com distintas concentrações de 4-metilesculetina estão representados por média ± D.P.M.

[0060] As nanopartículas foram obtidas com a adição de tripolifosfato de sódio foram mensurados o tamanho, o índice de polidispersividade (PDI), o potencial zeta, o grau de intumescimento e a eficiência de incorporação da 4-ME das nanopartículas (Tabela 2) para determinar a melhor encapsulação do ativo.

**Tabela 2** – Caracterização das nanopartículas.

Nanopartículas	Tamanho (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)	EI(%)
Vazias	221,5±70,32	0,442±0,011	+23,40±0,65	-----
0,33 mg/mL	199,4±40,64	0,433±0,082	+11,80±0,85	91,528
0,53 mg/mL	191,7±16,06	0,378±0,075	+7,37±1,70	93,883
0,80 mg/mL	215,1±62,75	0,598±0,134	+19,30±2,17	96,507

Os dados da caracterização das nanopartículas com diferentes concentrações de

4-metilesculetina estão representados por média  $\pm$  D.P.M.

[0061] Consequente a escolha das melhores nano e micropartículas de formulação, foram direcionadas para as demais caracterizações.

[0062] Morfologia:

[0063] A morfologia das partículas determina a área de contato com o local inflamado, desta maneira, as formas arredondadas aumentam a probabilidade de adesão devido a maior superfície de contato e aumentam a quantidade de transporte/fluxo de drogas para o local de ação. Ademais, o movimento browniano, aleatório, das partículas no lúmen aumenta a probabilidade de adesão na mucosa intestinal. Deste modo, as nano e micropartículas do nosso trabalho podem demonstrar maior adesão, pois possuem morfologia esférica (Figura 1) o que pode aumentar o tempo de permanência e de liberação da 4-ME no local inflamado.

[0064] Ensaio de mucoadesão:

[0065] Após a seleção das partículas realizaram-se testes de mucoadesão (Figura 2) e testes de liberação *in vitro* em pH = 3 (Figura 3), que são testes importantes para mimetizar as condições do cólon.

[0066] Tanto as nanopartículas quanto as micropartículas tiveram uma liberação da 4-ME menor em simulação de fluido gástrico (pH = 1,2) equivalente a 35,79 % e 28,68 %, respectivamente, e gradual nos meios de simulação de fluido intestinal (pH = 7,4) e colônico (pH = 6,0). Assim, as nano e micropartículas selecionadas demonstraram ser promissoras para teste em ratos com doença inflamatória intestinal induzida por TNBS devido a sua mucoadesividade e estabilidade em fluido de simulação gástrico.

**RESUMO****PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA**

A presente patente de invenção (PI) diz respeito a um processo de obtenção de nano e micropartículas encapsulando 4-metilesculetina (4-ME) e avaliação no tratamento da doença inflamatória intestinal. Assim, o dito processo pode ser categorizado como um produto farmacêutico e/ou farmacologicamente ativo tendo em vista que se trata de um processo de obtenção de nano/micropartículas poliméricas preferencialmente utilizando a quitosana como polímero, e, diante disso possui aplicação direta nas áreas de farmácia, medicina, biomedicina, química e biotecnologia. Ainda, esta invenção descreve a encapsulação do princípio ativo 4-ME nas nano/micropartículas para tratamento preferencial de doença inflamatória intestinal. Para desenvolvimento do dito processo de obtenção de nano/micropartículas poliméricas empregando quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio pelo método de gelificação ionotrópica, bem como as nano/micropartículas obtidas, as seguintes etapas de 1 e 2 devem ser consideradas: (1) preparo da solução de quitosana e tripolifosfato de sódio separadamente e (2) gelificação ionotrópica. Por fim, evidencia-se que o nano/microencapsulamento da 4-ME com polímeros adequados visa um melhor direcionamento e liberação do ativo no tecido alvo, e conseqüentemente, aumenta a sua biodisponibilidade e efeito terapêutico. Além disso, o produto final pode ser um ingrediente ativo para novas formulações farmacêuticas.

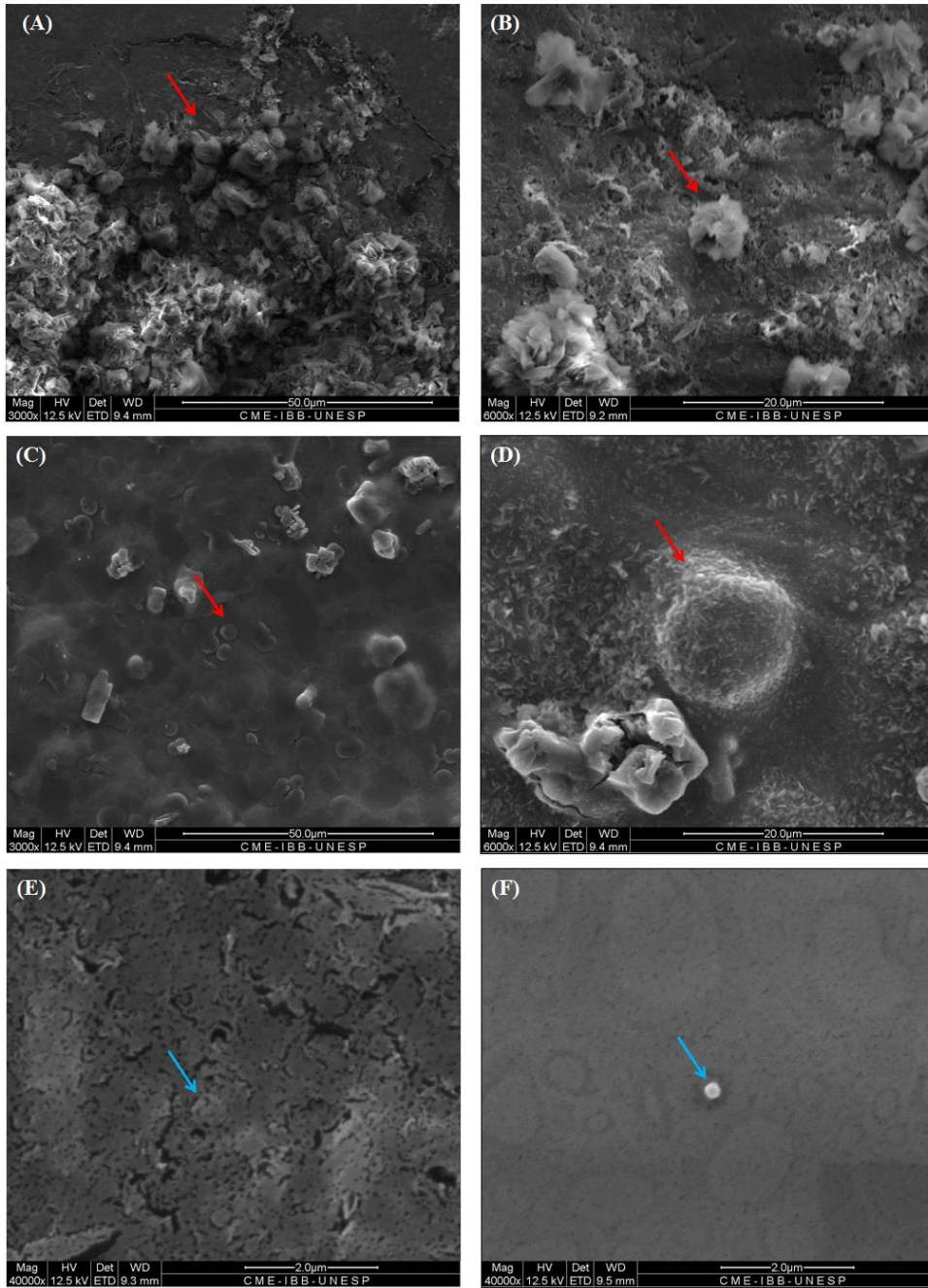
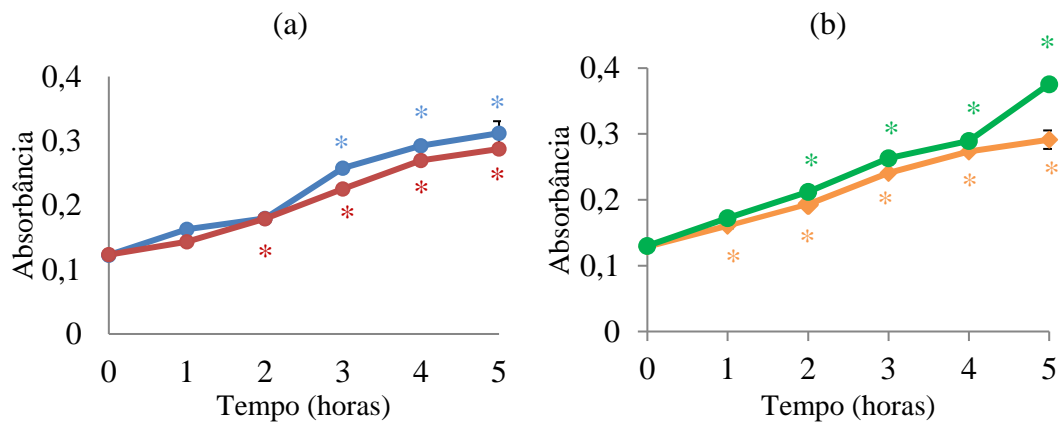
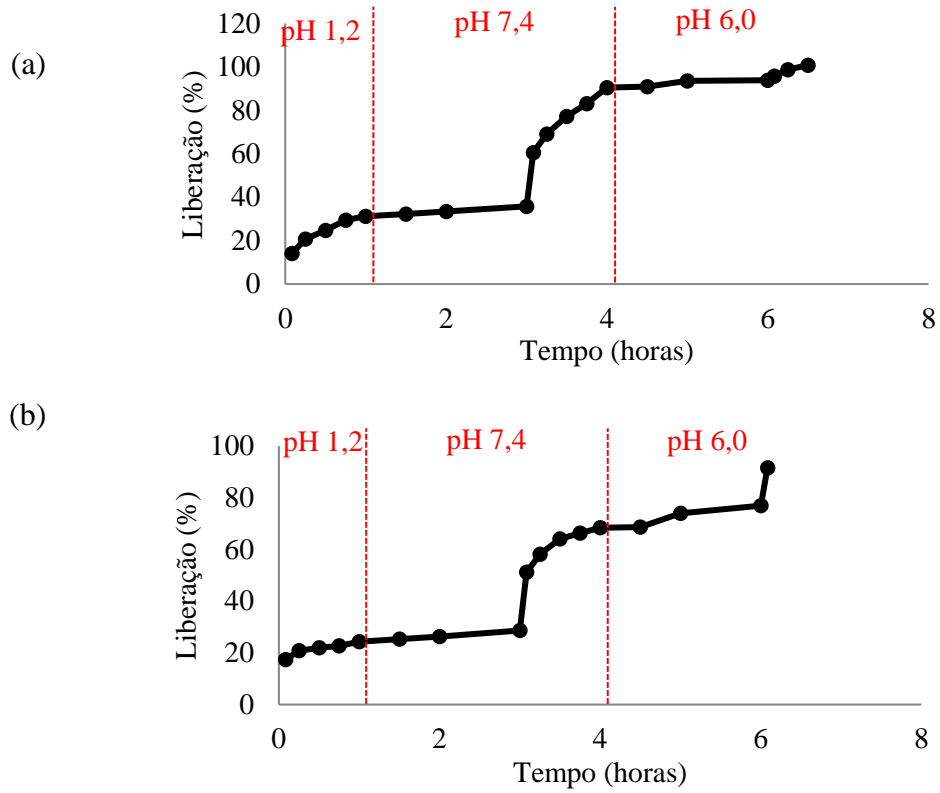
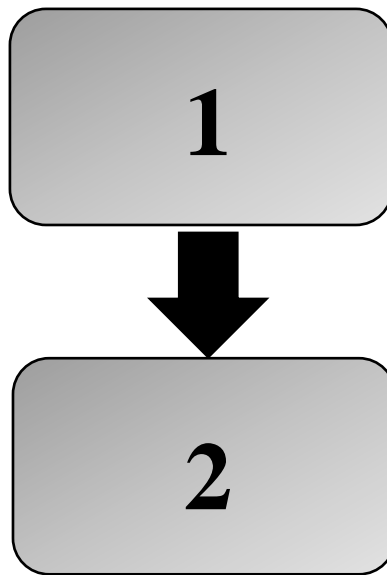


Figura 1.

**Figura 2.**



**Figura 3.****Figura 4.**

## REIVINDICAÇÕES

**1. NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA E PRODUTO OBTIDO**, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO POR** compreenderem: 0,05-0,2% (nano) e 0,5- 2,0% (micro) de polímero aceitáveis, preferencialmente quitosana, reticulado por gelificação inotrópica preferencialmente por tripolifosfato de sódio, mais especificamente de 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL de 4-ME.

**2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA, CARACTERIZADO POR** obter nano e micropartículas poliméricas encapsulando 4-ME por gelificação ionotrópica, preferencialmente desenvolvida por meio das etapas (1) e (2);

**3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA E PRODUTO OBTIDO**, de acordo com a reivindicação 1 e 2, **CARACTERIZADO POR** a etapa (1) envolver o preparo de solução de contendo polímero e solução contendo tripolifosfato de sódio e fármaco, e, para o preparo da nano/micropartícula, referenciada como a fase de tripolifosfato de sódio, deve ser vertida sobre a fase de quitosana lentamente e sob agitação vigorosa, a qual deve compreender o emulsificante, sob 25 C;

**4. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA E PRODUTO OBTIDO**, de acordo com a reivindicação 1 e 2 **CARACTERIZADO POR** a fase de tripolifosfato compreender fármaco;

**5. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO 4-METILESCULETINA E PRODUTO OBTIDO**, de acordo com a reivindicação 1 e 2, **CARACTERIZADO POR** a etapa (2) envolver a gelificação ionotrópica, onde, a mistura deve vigorosamente agitada (10 a 30 minutos) utilizando, por exemplo, um agitador mecânico, ou outro equipamento agitador;

6. **PRODUTO**, obtido pelo processo das reivindicações de 1 e 2, **CARACTERIZADO POR** ser um produto farmacêutico e/ou farmacologicamente ativo, mais especificamente nano e micropartículas poliméricas que encapsulam o fármaco 4-ME aplicado preferencialmente para tratamento de doença inflamatória intestinal;

7. **PRODUTO**, obtido pelo processo das reivindicações de 1 e 2, **CARACTERIZADO POR** ser um produto farmacêutico e/ou farmacologicamente ativo, mais especificamente nano e micropartículas poliméricas que encapsulam o fármaco 4-ME que estão prontas para aplicação após o término das etapas (1) e (2);

8. **PRODUTO**, obtido pelo processo das reivindicações de 1 e 2, **CARACTERIZADO POR** ser um produto farmacêutico e/ou farmacologicamente ativo, mais especificamente micropartículas lipídicas sólidas que encapsulam o fármaco 4-ME que podem ser aplicados em diferentes formulações farmacêuticas.