



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

(21) BR 102016023420-4 A2

(22) Data do Depósito: 07/10/2016

(43) Data da Publicação: 02/05/2018



(54) **Título:** MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

(51) **Int. Cl.:** C08G 63/08; C08G 63/66; A61K 47/14; A61K 47/10; A61K 47/08

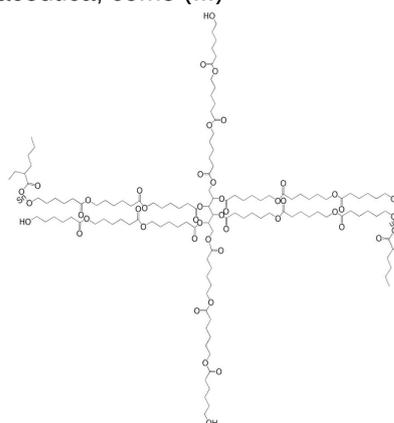
(52) **CPC:** C08G 63/08, C08G 63/66, A61K 47/14, A61K 47/10, A61K 47/08, C08J 2367/04

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

(72) **Inventor(es):** PATRÍCIA LOPES BARROS DE ARAÚJO; ELMO SILVANO DE ARAÚJO; INGRID SUELY MELO DE LIMA

(74) **Procurador(es):** UFPE

(57) **Resumo:** O relatório desenvolvido traz a síntese de copolímeros anfífilos constituídos por domínio do poliéster, e uma parte hidrofílica, podendo ser um polímero hidrofílico ou um açúcar-álcool. A síntese desses originou copolímeros tribloco e em estrela, os quais foram caracterizados por RMN, FT-IR e DR-X. Posteriormente os copolímeros foram matérias-primas para confecção de micelas biodegradáveis, que serão usadas para liberação controlada de fármacos. A fabricação dessas micelas foi através de um processo simples, de baixo custo e de tempo de produção relativamente reduzido, sendo considerando também que houve uma diminuição na utilização de uma gama de excipientes, comumente encontradas nas formas convencionais de liberação controlada. As micelas foram caracterizadas pelo tamanho, cujo os valores foram inferiores a 1 μm e através da estabilidade, em que micelas formadas por copolímero estrela demonstraram maior estabilidade. As micelas ainda passaram pela radioesterilização e não foram detectadas presença de subprodutos de radiólise. Esses resultados mostram-se promissores para aplicações destes materiais na indústria farmacêutica, como (...)



MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

[001] O presente relatório revela micelas poliméricas formadas por copolímeros em bloco constituídos por polímeros tribloco ou estrela contendo domínios hidrofóbicos e hidrofílicos. Estes, como dispositivos nanométricos para aplicação parenteral de fármacos de liberação controlada.

[002] O produto confeccionado é um dispositivo de escala nanométrica podendo encapsular uma ou mais drogas, que podem ser liberadas conforme interação molecular com os polímeros utilizados e com o meio biológico. O produto poderá ser utilizado em pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

[003] Não foram encontrados nos registros de patentes tanto nacionais, como internacionais, evidências documentadas a respeito de micelas de copolímeros sintéticos em bloco para liberação controlada de fármacos, conforme o dispositivo apresentado.

[004] A nanotecnologia farmacêutica, uma subárea da nanotecnologia, tem por objetivo desenvolver nanopartículas contendo fármacos, que venham oferecer vantagens em relação aos seus homólogos nas formas convencionais (LAMMERS et al., 2011). Suas vantagens encontram-se na capacidade de transportar o fármaco através de barreiras intransponíveis para o local específico de ação, melhoramento da atividade terapêutica com máximo de segurança, além do retardo da degradação da droga e a redução de possíveis efeitos colaterais (ETHERIDGE et al., 2013). As principais nanopartículas carreadoras de drogas já testadas como carreadoras de drogas são: lipossomos, nanopartículas de lipídios sólidos, dendrímeros, nanopartículas de homo ou copolímeros, nanopartículas carbonáceas, de silício ou de materiais magnéticos e pontos quânticos (SOPPIMATH et al., 2001; MUDSHINGE et al., 2011, WILCZEWSKA et al., 2012).

[005] Neste relatório, apresentamos materiais poliméricos constituídos em blocos de domínio hidrofílico ligados a blocos de domínio hidrofóbico, formando estruturas poliméricas de caráter anfifílico. Quando dispersas em meio aquoso, estas moléculas se agregam em partículas de dimensões nanométricas, que são micelas, de

maneira que dispersões coloidais são obtidas. Os polímeros utilizados para a construção de blocos hidrofóbicos são, mas não restritos a: poliésteres de hidroxiácidos carboxílicos alifáticos (PHAs) com meros de cadeias lineares ou ramificadas, contendo de 2 a 6 carbonos, e seus copolímeros estatísticos ou em bloco. Os blocos hidrofóbicos podem ser constituídos de estruturas poliméricas tais como, mas não restritos a: Poli (óxido de metileno) (POM), Poli (óxido de etileno) (PEO), Poli (óxido de propileno) (POP), Poli (ácido acrílico) (PAA), Poliacrilamida (PAM), Poli (vinilpirrolidona) (PVP), Poli (álcool vinílico) (PVA); ou ainda estruturas monoméricas poli-hidroxiladas e de baixa massa molar, tais como, mas não restritas a: sorbitol, xilitol, manitol, aldo ou cetoesoses, aldo ou cetopentoses.

[006] Os materiais apresentados neste relatório apresentam domínios hidrofóbicos altamente variáveis, o que permite a encapsulação de moléculas com diferentes estruturas, solubilidade e carga iônica, o que contribui para a versatilidade do sistema. Enquanto que a parte hidrofílica é formada por materiais biocompatíveis que minimizam interações indesejadas com os componentes celulares (MIYATA, 2011).

[007] O método utilizado para a síntese das micelas com encapsulamento do fármaco foi a emulsificação-evaporação do solvente. Neste método, o fármaco disperso ou dissolvido é emulsificado por um solvente orgânico que contém o copolímero, resultando em pequenas gotículas em meio aquoso. O solvente orgânico usado é removido por evaporação e o fármaco e o polímero dão origem às micelas (DONNELL, 1997). A técnica é frequentemente escolhida por ser simples, de baixo custo e de tempo de confecção relativamente reduzido (YEO et al., 2001).

[008] As micelas produzidas apresentam boa estabilidade e melhoraram a solubilidade de drogas em diferentes meios de dispersão, devido a sua ampla interação, permitindo a modulação das quantidades de fármacos liberados pelo dispositivo.

[009] A invenção objetiva a síntese e aplicação de micelas poliméricas para liberação controlada de fármacos, cujos resultados serão descritos a seguir.

[010] Os dispositivos micelares reivindicados neste relatório terão aplicação direta na indústria farmacêutica, por apresentar características vantajosas, tais como: alto percentual de encapsulação, composição química constituída de materiais GRAS

(*generally recognized as safe*)(USA, 2016), possibilidade de manutenção da concentração do fármaco por longo período, promovendo intervalos de tempo da administração mais prolongados e redução dos efeitos colaterais. Os dispositivos têm fabricação simples, baixo custo e tempo relativamente reduzido de confecção; além de não necessitarem de vasta gama de excipientes quando comparado com as atuais formas convencionais de liberação (YEO et al., 2001).

[011] A fabricação do objeto reivindicado nesse relatório é feita primeiramente pela síntese dos copolímeros utilizando os monômeros de lactona adequados, em proporções que podem variar de 1:15 a 1:120 em relação aos componentes do domínio hidrofílico. Iniciadores estanados são utilizados para promover a abertura do anel lactônico. Os reagentes são dissolvidos em solvente orgânico e a mistura é purgada com nitrogênio. O tempo médio de reação é de 48 horas, em temperaturas variando entre 100° e 150° C. Após o tempo reacional, o produto final é dissolvido com clorofórmio, tetraidrofurano (THF) e dimetilformamida (DMF), e em seguida precipitado com solvente apolar. Este produto foi utilizado para confecção das micelas copoliméricas contendo diversos fármacos em proporções de 0,1 a 10%.

[012] A caracterização dos copolímeros foi realizada por diversos métodos, por exemplo: ressonância magnética nuclear (VARIAN, NMR System) de hidrogênio (RMN-¹H) e carbono-13 (RMN-¹³C) para determinação dos grupos químicos característicos e do grau de polimerização, pela comparação das áreas dos picos de ¹H característicos do poliéster com as áreas dos picos de grupos característicos dos açúcares-álcool ou dos polímeros hidrofílicos, posto que apresentassem massas molares numéricas médias conhecidas, fornecidas pelos respectivos fabricantes. Por exemplo, os copolímeros, estrela policaprolactona-sorbitol (PCL-sorbitol) (Figura 1 do anexo) e o tribloco policaprolactona-*b*-polietilenoglicol-*b*-policaprolactona (PCL-*b*-PEG-*b*-PCL) (Figura 2 do anexo) tiveram o grau de polimerização determinado por RMN-¹H, o que resultou em 4 meros provenientes da abertura do anel da ϵ -prolactona em cada braço da estrela (Figura 3 do anexo), que, somados à massa do sorbitol, resulta em massa molar média de 2736 g/mol, enquanto o copolímero linear do tribloco policaprolactona-polietilenoglicol-policaprolactona (PCL-*b*-PEG-*b*-PCL) apresentou 11 meros de ϵ -

caprolactona em cada lado do polietilenoglicol (Figura 4 do anexo), resultando em uma massa molar de 8508 g/mol. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Espectrômetro 4600-JASCO, Japan) foi utilizada para determinação dos grupos químicos característicos dos copolímeros estrela PCL-sorbitol e o tribloco PCL-*b*-PEO-*b*-PCL, respectivamente (Figuras 5 e 6 do anexo). Foi realizado a difratometria de raio-X (D8 Advanced – BRUKER, Germany), para análise da cristalinidade, em que o grau de cristalinidade foi em torno de 80% para ambos os copolímeros. Nos difratogramas tanto o copolímero estrela PCL-sorbitol (Figura 7 do anexo) como o do tribloco PCL-*b*-PEO-*b*-PCL (Figura 8 do anexo) apresentaram os picos em 21,5° e 23,7°, sendo esses referentes aos picos da policaprolactona (Figura 9 do anexo). Para a caracterização das micelas, foram analisados o tamanho das partículas e sua estabilidade, através de aparelho de determinação de tamanho de partículas e carga superficial por potencial zeta (ZETASIZER- Malvern, UK). Realizaram-se também, testes de percentual de eficiências do encapsulamento e a taxa de liberação das micelas por determinação quantitativa dos fármacos liberados por UV-Vis (V730- JASCO, Japan). As taxas de liberação de fármacos das micelas foram determinadas *in vitro*, através da diálise de suspensões micelares contra solução de tampão fosfato salino pH 7,4, à temperatura ambiente, no período de 30 dias. Além disso, as micelas foram radioesterilizadas a 25 kGy com radiação gama (⁶⁰Co), dose de referência recomendada pela Farmacopeia Brasileira para produtos termoestáveis (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (SHIMADZU-PROMINENCE, Japan) para determinação subprodutos de radiólise dos fármacos.

[013] Como modelos para incorporação de fármacos, foram testados a finasterida e o paracetamol. A finasterida é um azoesteróide inibidor da 5-alfa-redutase, usado na terapia da hiperplasia benigna da próstata e na prevenção do câncer da próstata. Este fármaco apresenta-se como um pó branco, altamente cristalino e insolúvel em água (BUDAVARI, 1996). Enquanto o paracetamol é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas, que se apresenta em forma de pó cristalino branco e solúvel em água (KOROLKOVAS, 1988). É uma droga que ultrapassa a barreira

hematoencefálica e age no sistema nervoso central (BOSCH et al., 2006; MARZUILLO et al., 2014).

[014] Os tamanhos das micelas apresentaram-se inferiores a 1000 nm (Tabela 1), valor dentro do permitido para administrações parenterais (BETINA et al., 2011). As micelas formadas pelo copolímero tribloco PCL-*b*-PEG-*b*-PCL com e sem radioesterilização, apresentaram valores de potencial zeta -15 mV e -17 mV, respectivamente, enquanto que, nas micelas formadas pelo copolímero estrela PCL-sorbitol, o potencial zeta variou entre -18 mV a -40 mV (Tabela 2). Estes limites são considerados como representativos de micelas estáveis para diversos autores (ROLAND, 2013; QUAGLIA, 2007)

[015] A eficiência do encapsulamento de fármacos nas micelas fabricadas foi acima de 50%, em moles (Tabela 3). A taxa de liberação dos fármacos a partir das micelas foi maior para o paracetamol (Figura 10 do anexo). As micelas radiosterilizadas contendo paracetamol não apresentaram produtos de radiólise deste fármaco evidenciados por HPLC (Figura 11). As evidências apresentadas neste relatório sugerem que as micelas apresentadas são carreadores nanométricos estáveis para fármacos de diferentes naturezas químicas podem ser radioesterilizadas sem perder a estabilidade e são capazes de carrear fármacos irradiados ou não irradiados com eficiência e liberá-los de maneira controlada e prolongada, por intervalo de até 30 dias, em meio aquoso.

[016] Lista de referências bibliográficas

[017] AGNIESZKA Z. W.; KATARZYNA, N.; KAROLINA, H. M., HALINA C. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, p.1020-1037, 2012.

[018] ALVAREZ, L.C.; CONCHEIRO, A. Molecularly imprinted polymers for drugs delivery. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci**; v.804, n.1, p.231-245, 2004.

[019] BAWARSKI, W. E.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D. J.; MOUSA, S. A.; Nanomed. **Nanotechnol. Biol. Med.**, v. 4, p.273, 2008.

- [020] BETINA, G.; ZANETTI, R.; SECCON, A.; Nanotecnologia como inovação para produtos farmacêuticos e cosméticos. **Revistas Técnica do Farmacêutico** – ANFARMAG (Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais). n 11, 2011.
- [021] BOSCH, E. M., et al. Determination of paracetamol: historical evolution. **J Pharm Biomed Anal**, v. 42, p. 291-321, 2006.
- [022] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília. **Farmacopeia Brasileira**; v. 2, p. 852, 2010.
- [023] BUDAVARI, S. The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. **Merck & Co.** p. 1741, 1996.
- [024] BURTON, G.F.L.; STENSEL, H.D. Waste water Engineering, Treatment and Reuse, 4th edition, McGraw-Hill, New York, 2003.
- [025] DONNELL, P. B.; McGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 25-42, 1997.
- [026] ETHERIDGE, M. L.; CAMPBELL, S. A.; ERDMAN, A. G.; HAYNES, C. L.; WOLF, S. M.; MCCULLOUGH, J.; Nanomed. Nanotechnol. **Biol. Med.** v. 9, p. 1. 2013,
- [027] KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**, 1988.
- KUMARESH, S. S.; TEJRAJ, M. A.; ANANDRAO, R. K.; WALTER, E. R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.
- [028] LAMMERS, T.; AIME, S.; HENNINK, W. E.; STORM, G.; KIESSLING, F.; **Acc. Chem. Res.**, v. 44, p. 1029, 2011.
- [029] MARZUILLO, P.; GUARINO, S.; BARBI, E. Paracetamol: a focus for the general pediatrician. **Eur J Pediatr**. v.173, p. 415-25, 2014.
- [030] Mc. BRAIN, J.; **Trans. Faraday Soc.**, v. 9, p. 99, 1913.
- [031] MIYATA, K.; CHRISTIE, R. J.; KATAOKA, K.; **React. Funct. Polym.**, v. 71, p. 227, 2011.

- [032] MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C.; **The FASEB Journal**, v. 19, p. 311, 2005.
- [033] QUAGLIA, F.; OSTACOLO, L.; NESE, G.; CANCEILLO, M.; ROSA, G.; UNGARO, ROSARIO, F.P.; IMMACOLATA, M.R; MAGLIO, G. Micelles based on amphiphilic PCL-PEO triblock and star-shaped diblock copolymers: Potential in drug delivery applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2007.
- [034] ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B.; **Int. J. Pharm.** v. 263, p. 85, 2003.
- [035] SAGAR, R. M.; AMOL, B. D.; SACHIN, P., CHETAN, M. B. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, p. 129–141, 2011.
- [036] TORCHILIN, V. P.; **Pharm. Res.**, v. 24, p. 1, 2007.
- [037] USA, 2016 . Food and Drug Administration- FDA - GRAS Substances (SCOGS) Database.
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/default.htm>. Aceso em 14/09/2016.
- [038] YEO, Y; BAEK, N; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**; v. 6, n. 4, p. 213-230, 2001.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE SÍNTESE DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS; este caracteriza por:
 - a) Copolímero em estrela PCL-sorbitol sintetizado pelos reagentes sorbitol e ϵ -caprolactona, nas proporções em mols: 1:15 e 1:120, respectivamente;
 - b) Copolímero em estrela PCL-sorbitol sintetizado pelo período de 48h e temperatura variando entre 100° a 150°C.

2. PROCESSO DE SÍNTESE DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS; visto que a síntese já existe, porém este caracteriza por:
 - a) Copolímero tribloco PCL-*b*-PEO-*b*-PCL sintetizado pelos reagentes polietilenoglicol e ϵ -caprolactona, nas proporções em mols: 1:15 e 1:120, respectivamente;
 - b) Copolímero tribloco PCL-*b*-PEO-*b*-PCL sintetizado pelo período de 48h e temperatura variando entre 100° a 150°C.

3. PROCESSO DE CONFECÇÃO DAS MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS; esta caracteriza por:
 - a) Micelas copolimérica formada pelo copolímero PCL-sorbitol, para liberação controlada de fármaco em proporção de 0,1 a 10%, em peso.

4. PROCESSO DE CONFECÇÃO DAS MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS. De acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo mesmo procedimento aplicando-se aos fármacos finasterida, paracetamol, nimesulida, ibuprofeno, furosemida e propranolol.

5. PROCESSO DE CONFECÇÃO DAS MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS. De acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelas micelas copoliméricas radioesterilizáveis por radiação gama ^{60}Co , dose 25 kGy.

FIGURAS

Figura 1:

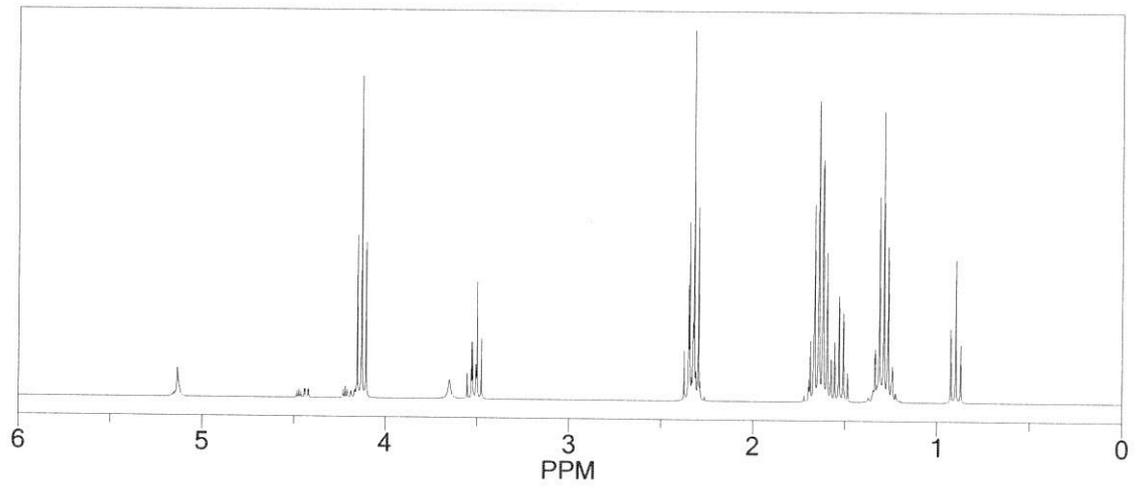


Figura 2:

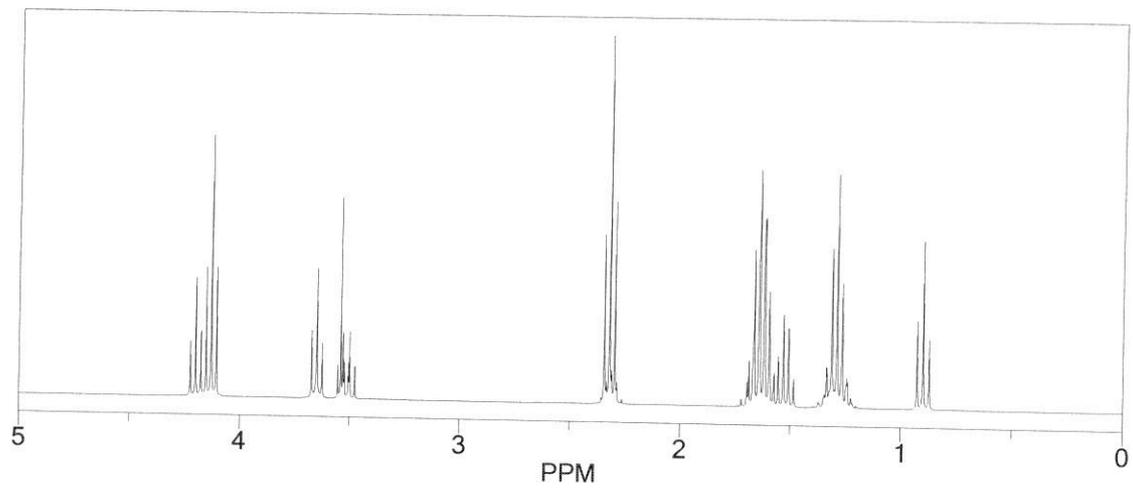


Figura 3:

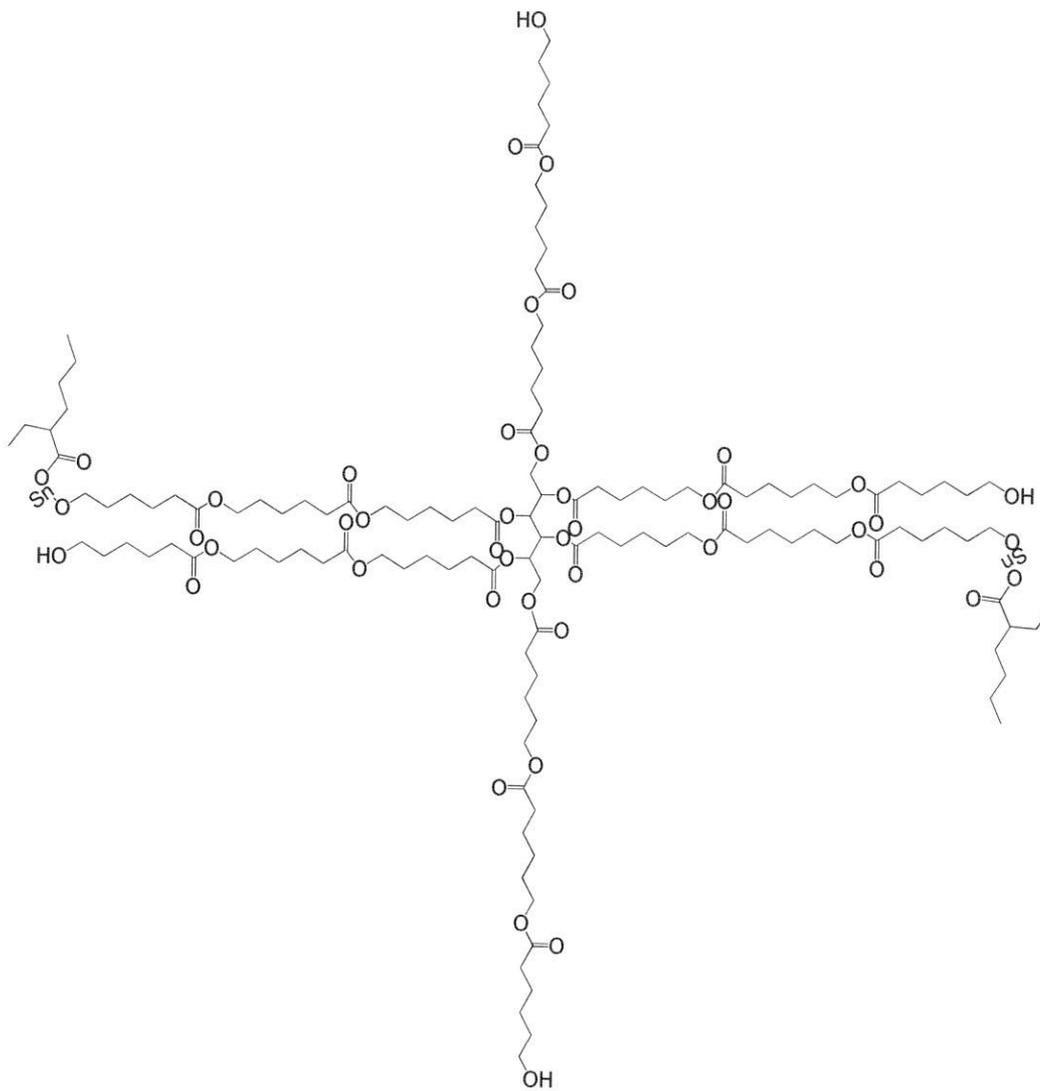


Figura 4:

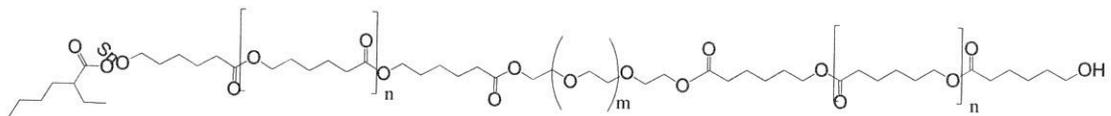


Figura 5:

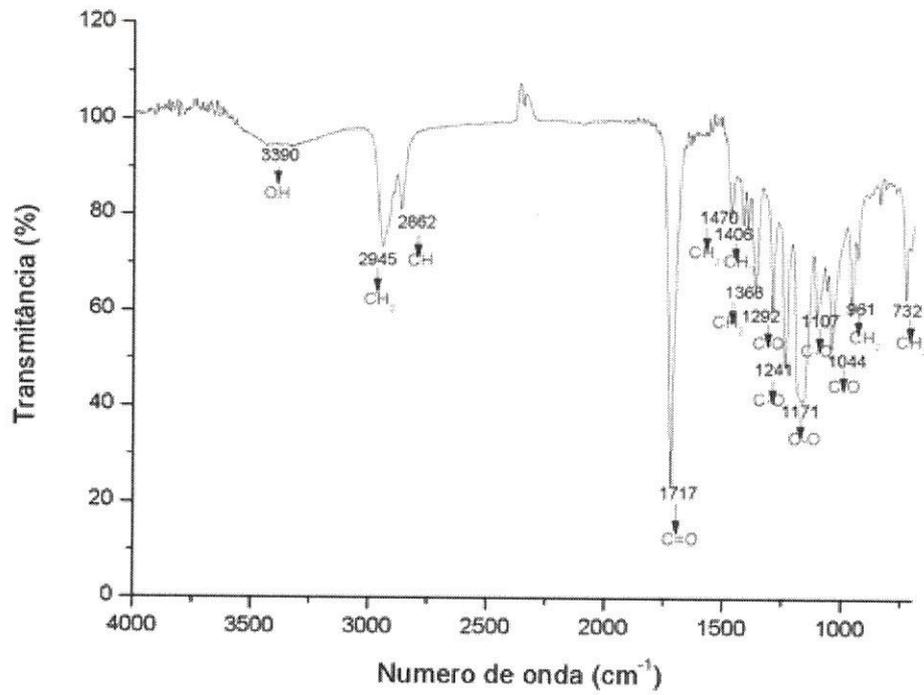


Figura 6:

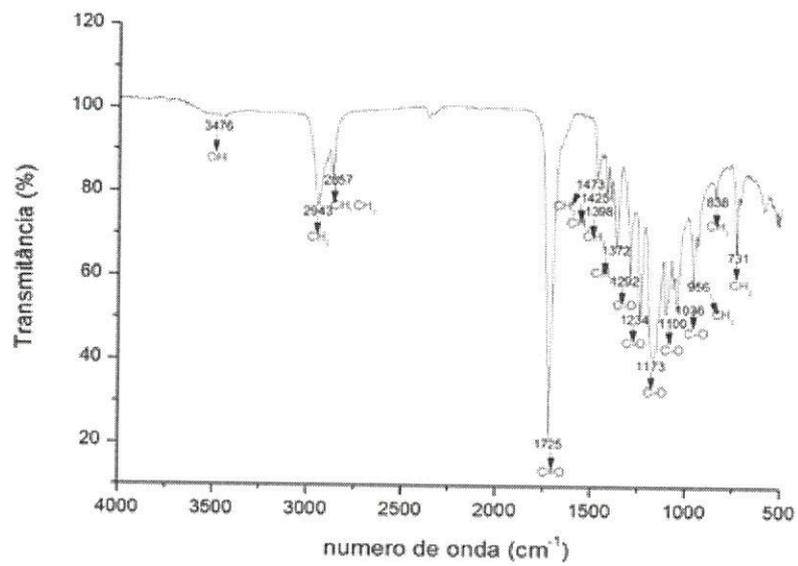


Figura 7:

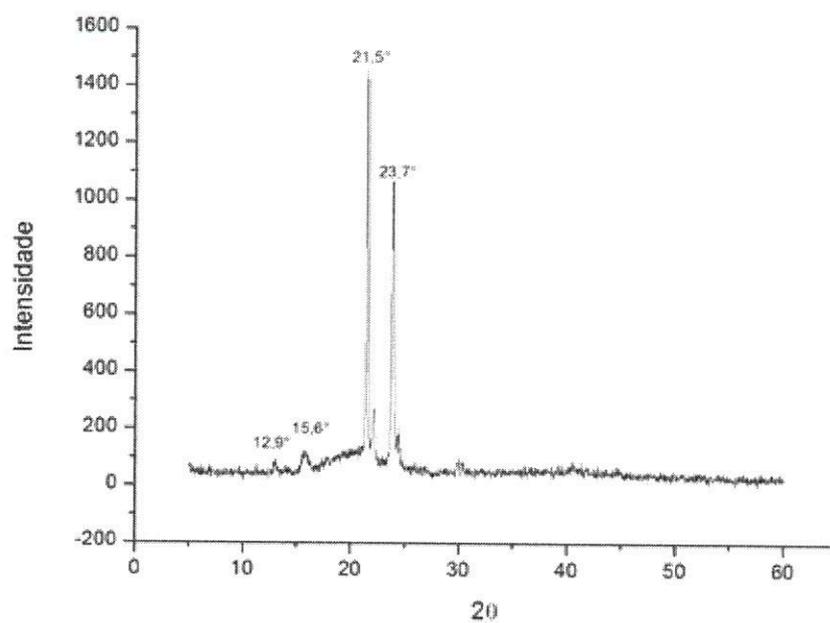


Figura 8:

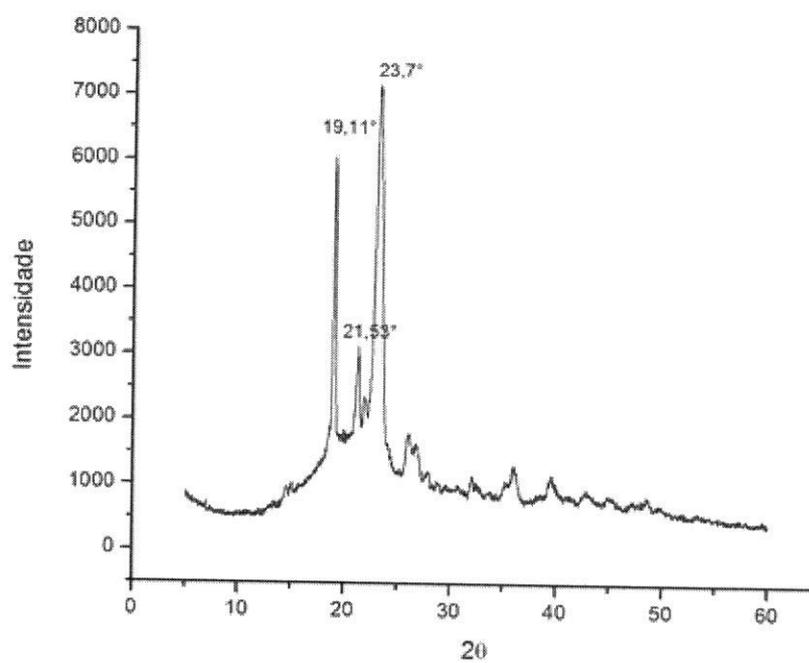


Figura 9:

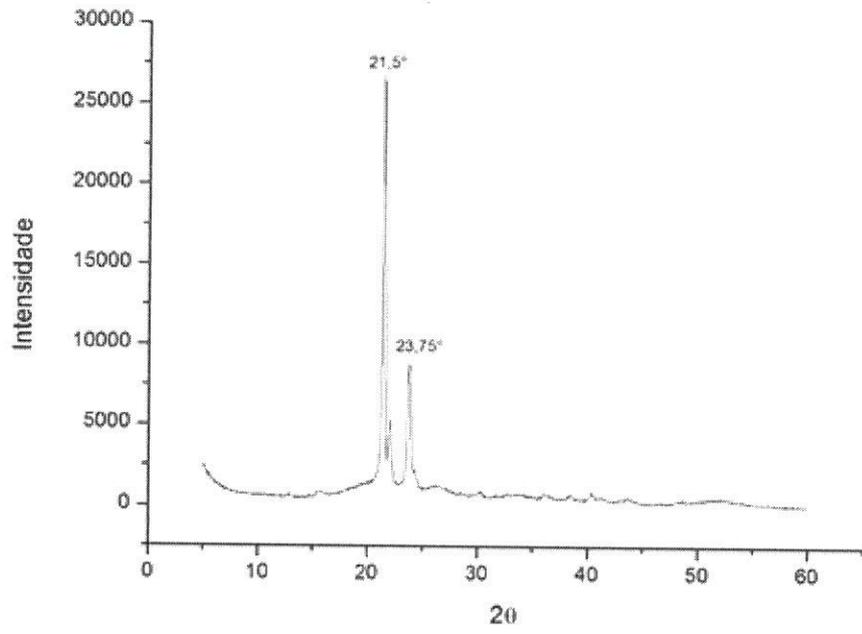


Tabela 1:

Copolímero/carga	Distribuição de tamanho (%)		
	10-100 nm	101-500 nm	501-1000 nm
PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL/ finasterida	78,1	21,9	0
PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL/ finasterida (25 kGy)	85,7	14,3	0
(PCL-Sorbitol)/finasterida	0	99,5	0,5
(PCL-Sorbitol)/paracetamol	0	99,8	0,2
(PCL-Sorbitol)/nimesulida	0	99,9	0,1
(PCL-Sorbitol)/ibuprofeno	0	99,9	0,1
(PCL-Sorbitol)/furosemida	48	51,2	0,8
(PCL-Sorbitol)/propranolol	0	99,7	0,3

Tabela 2:

Micelas estabilizadas com SDS	Potencial zeta (mV)
PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL/finasterida	-17
PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL/finasterida (25 kGy)	-15
(PCL-Sorbitol)/finasterida	-35,7
(PCL-Sorbitol)/paracetamol	-39,3
(PCL-Sorbitol)/nimesulida	-26,2
(PCL-Sorbitol)/ibuprofeno	-21,5
(PCL-Sorbitol)/furosemida	-27,3
(PCL-Sorbitol)/propranolol	-17,7

Tabela 3:

Micelas	(mol%)
(PCL-Sorbitol)/finasterida	91,7
(PCL-Sorbitol)/paracetamol	63,5

Figura 10:

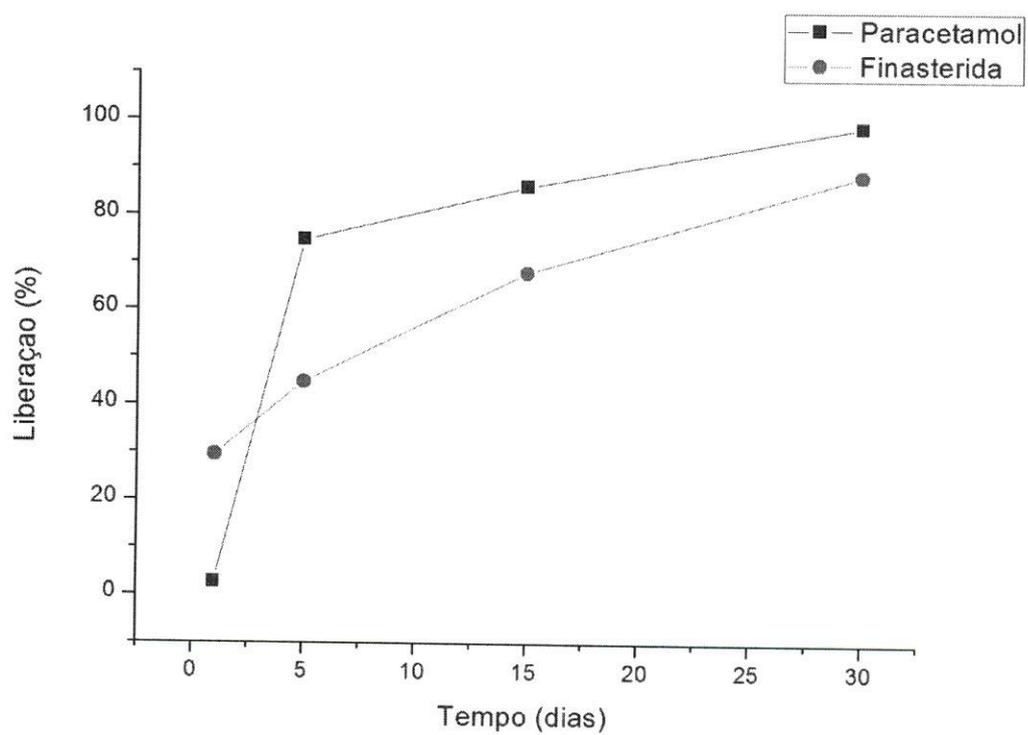
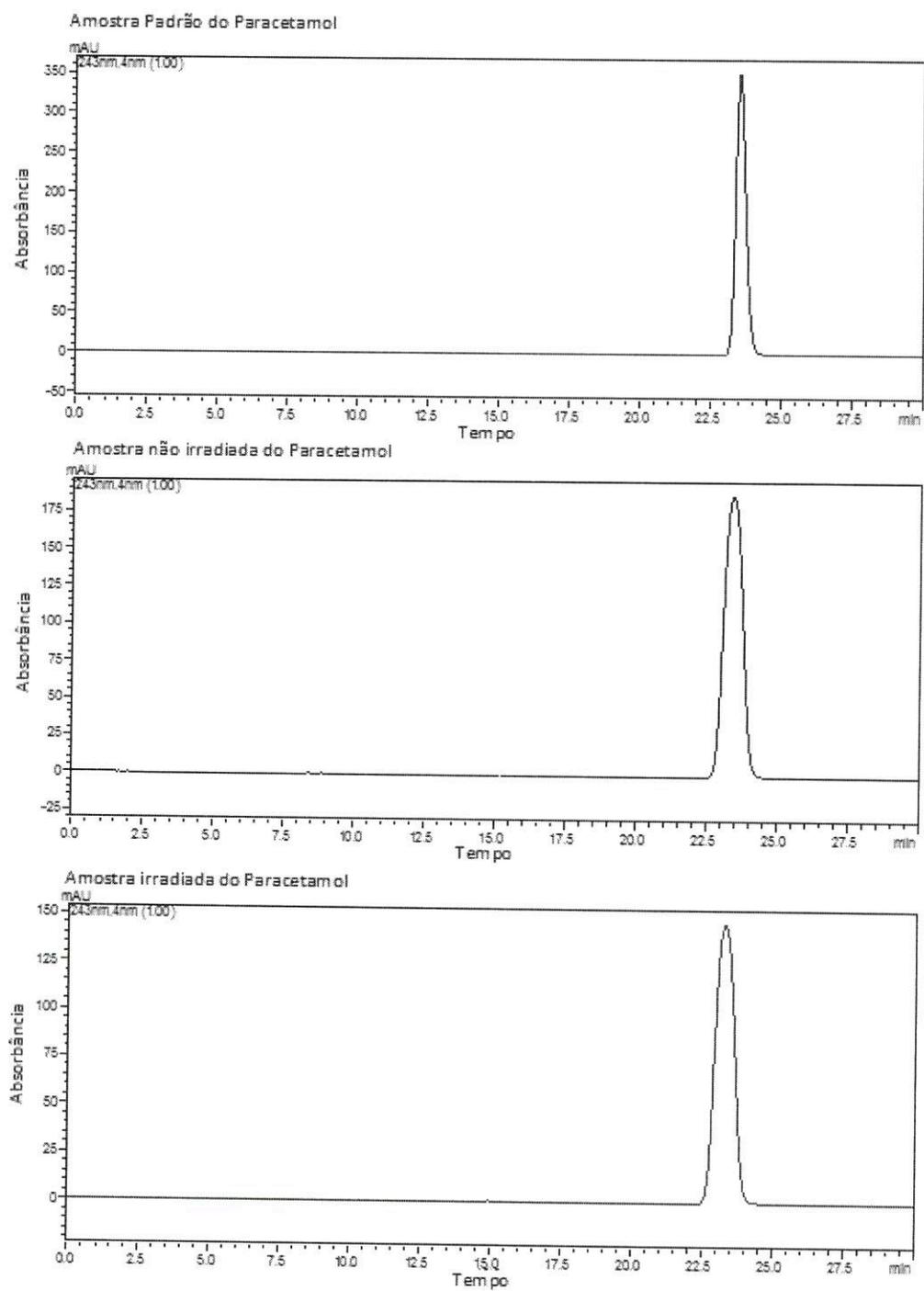


Figura 11:



RESUMO

MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO BIODEGRADÁVEIS PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

O relatório desenvolvido traz a síntese de copolímeros anfífilicos constituídos por domínio do poliéster, e uma parte hidrofílica, podendo ser um polímero hidrofílico ou um açúcar-álcool. A síntese desses originou copolímeros tribloco e em estrela, os quais foram caracterizados por RMN, FT-IR e DR-X. Posteriormente os copolímeros foram matérias-primas para confecção de micelas biodegradáveis, que serão usadas para liberação controlada de fármacos. A fabricação dessas micelas foi através de um processo simples, de baixo custo e de tempo de produção relativamente reduzido, sendo considerando também que houve uma diminuição na utilização de uma gama de excipientes, comumente encontradas nas formas convencionais de liberação controlada. As micelas foram caracterizadas pelo tamanho, cujo os valores foram inferiores a 1 μm e através da estabilidade, em que micelas formadas por copolímero estrela demonstraram maior estabilidade. As micelas ainda passaram pela radioesterilização e não foram detectadas presença de subprodutos de radiólise. Esses resultados mostram-se promissores para aplicações destes materiais na indústria farmacêutica, como dispositivos de liberação controladas de fármacos radioesterilizáveis por radiação gama ^{60}Co