



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

(21) PI 1106193-6 A2

(22) Data do Depósito: 11/10/2011

(43) Data da Publicação: 10/11/2015
(RPI 2340)



(54) Título: PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS

(51) Int. Cl.: A61K 9/51; A61K 47/36; A61K 31/722; A61K 47/48; A61K 33/24; (...)

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP

(72) Inventor(es): ADRIANA RAFFIN POHLMANN, SÍLVIA STANISÇUASKI GUTERRES, EDUARDO ANDRÉ BENDER, MARCELA FROTA CAVALCANTE, DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA

(57) Resumo: PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS. A presente invenção trata do processo sintético para a produção de nanopartículas multiparedes complexadas com metais ou íons metálicos, como por exemplo metais alcalinos ou alcalino terrosos, metais de transição ou terras raras, incluindo prata, ouro, platina, cobre, cádmio, cobalto, paládio, mais especialmente ferro ou zinco, que permite a ligação de pequenas moléculas, macromoléculas ou biomoléculas de origem sintética, biossintética ou natural, como, por exemplo, proteínas, peptídeos, fenóis, aminas, ácidos carboxílicos, sacarídeos, alcalóides, ácidos ribonucleicos ou desoxirribonucleicos, aptâmeros, anticorpos, anticorpos monoclonais e especialmente aminoácidos, proteínas, enzimas e fragmentos de anticorpos, constituindo uma inovação para o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados com superfície funcionalizada ou multifuncionalizada. A invenção prevê o uso do processo sintético para a funcionalização da superfície coloidal produzindo nanopartículas multiparedes decoradas, sendo que as nanocápsulas multiparedes decoradas pode(...)

PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS

Campo da invenção

A presente invenção trata do processo sintético para a produção de nanopartículas multiparedes complexadas com metais ou íons metálicos, como por exemplo metais alcalinos ou alcalino terrosos, metais de transição ou terras raras, incluindo prata, ouro, platina, cobre, cádmio, cobalto, paládio, mais especialmente ferro ou zinco, que permite a ligação de pequenas moléculas, macromoléculas ou biomoléculas de origem sintética, biossintética ou natural, como, por exemplo, proteínas, peptídeos, fenóis, aminas, ácidos carboxílicos, sacarídeos, alcalóides, ácidos ribonucléicos ou desoxirribonucléicos, aptameros, anticorpos, anticorpos monoclonais e especialmente aminoácidos, proteínas, enzimas e fragmentos de anticorpos, constituindo uma inovação para o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados com superfície funcionalizada ou multifuncionalizada. A invenção prevê o uso do processo sintético para a funcionalização da superfície coloidal produzindo nanopartículas multiparedes decoradas, sendo que as nanocápsulas multiparede decoradas podem ser usadas para o diagnóstico de doenças na área da saúde, como por exemplo, terapia genética, câncer, inflamação, doenças degenerativas.

Estado da técnica

As aplicações da nanotecnologia mostram o "efeito nano" para a faixa de algumas dezenas de nanômetros a 800 nm de diâmetro médio (Garnett e Kallinteri, 2006).

Dentre as nanopartículas poliméricas destacam-se as nanoesferas e as nanocápsulas (Schaffazick et al., 2003). As primeiras são compostas de polímeros

lineares distribuídos em matrizes nanoscópicas, enquanto que as segundas correspondem a um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica. Esses tipos de nanopartículas poliméricas se caracterizam por encapsular fármacos, ativos cosméticos ou agroquímicos. Recentemente, estudos desenvolvidos mostraram que nanocápsulas de núcleo lipídico (Guterres et al., 2001; Jager et al., 2009; Venturini et al., 2011) são diferenciadas de nanocápsulas poliméricas convencionais devido à sua supraestrutura que consiste em uma dispersão de substâncias lipofílicas líquida e sólida, revestida por uma única parede polimérica (Cruz et al., 2006; Jager et al., 2007; Jager et al., 2009).

A síntese de sistemas poliméricos nanoparticulados conjugados a anticorpos pode ser obtida a partir da utilização de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis como é o caso do poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido lático) (PLA) e da poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

Uma busca nos bancos de dados do ISI (Institute for Science Information) mostra a partir da década de 1990 um crescimento exponencial de publicações referentes à associação dos termos nano e fármacos, mostrando o desenvolvimento da área de nanotecnologia em saúde nesta virada de século. No mesmo sentido, na busca por patentes (Derwent Innovations Index - 1963-nov/2010) observam-se 4.381 patentes de base nanotecnológica depositadas para a saúde. Essas análises nos trazem nitidamente a relevância do tema e a importância do desenvolvimento científico e tecnológico na área de nanotecnologia em saúde.

Nos últimos anos, suspensões aquosas de nanopartículas poliméricas com diâmetro controlado foram desenvolvidas, baseado na variação da tensão interfacial da fase orgânica (Poletto et al., 2008). Paralelamente, a presença da parede

polimérica de nanocápsulas foi determinada por fluorimetria utilizando-se uma sonda de ambiente químico (Jager et al., 2007).

O uso da nanotecnologia em aplicações diagnósticas aumenta a expectativa da obtenção de sistemas mais eficientes para prevenção e diagnósticos clínicos, bem como no monitoramento de diversas patologias em nível molecular (Jain et al., 2005). O uso de anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpos que conservam a capacidade de ligação específica com o antígeno são investigados por diversos autores em diferentes aplicações (Shoenfeld et al. 2004; Lobo et al., 2008).

O uso de nanopartículas inteligentes contendo anticorpos e fragmentos de anticorpos é uma alternativa promissora para o diagnóstico de doenças. O desenvolvimento de nanopartículas conjugadas a fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) são especialmente desejáveis na busca da ligação em sítio específico mantendo-se um controle no reconhecimento molecular.

A estratégia de ligação das espécies moleculares ou macromoleculares na superfície das nanocápsulas multiparedes produzindo nanocápsulas multiparedes decoradas é baseada na quimissorção em sítio específico através da coordenação versátil de diversas funções no centro metálico sem produção de resíduos tóxicos. Essa solução representa um avanço tecnológico quando comparada às estratégias existentes de *click chemistry*, que em geral a conjugação polímero-proteína é baseada na formação de ésteres ou amidas pela conjugação de ácidos com alcoóis ou aminas, ou ainda, pelas reações de cicloadição [4+2] que necessitam de condições e funcionalizações específicas. A ativação de ácidos por carbodiimida para sua conjugação com aminas é largamente utilizada, mas tem o inconveniente da falta de controle do número de proteínas conjugadas e não oferece uma conjugação sítio específica (Boyer et al., 2011). A conjugação para a funcionalização

de polímeros pré-formados com proteínas baseada em um acoplamento covalente tem limitações, pois a eficiência da conjugação depende de uma série de parâmetros como o tipo e localização dos grupos funcionais nas biomoléculas, a área superficial das partículas, o número de moléculas ligadas ao carreador e o tipo de ligante. Nessas reações de acoplamento, a extensão do ligante e do agente de acoplamento podem reduzir a eficiência do processo devido ao impedimento estérico (acessibilidade diminuída) (Boyer et al., 2011).

O desenvolvimento de nanocápsulas multiparede munidas de sítios específicos de ligação para a coordenação dos sítio metálico com diferentes funcionalidades contendo átomos de nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, dentre outros, vem solucionar os problemas técnicos apresentados pelas estratégias geralmente utilizadas. A versatilidade da ligação de coordenação imprime a essa invenção uma potencialidade de aplicação em diferentes setores econômicos como o petroquímico, o de biocombustível, o agroquímico, o cosmético e higiene pessoal, e mais especialmente o farmacêutico. Além disso, a estratégia de ligação por reação interfacial por coordenação a sítio metálico imprime a versatilidade tão almejada pelos nanotecnólogos, a multifuncionalização de superfície de nanopartículas.

Descrição resumida da invenção

A invenção aqui proposta visa um processo sintético e uso de nanocápsulas multiparedes complexadas com íons metálicos. A invenção de resume no desenvolvimento de nanocápsulas multiparedes complexadas com íons metálicos capazes de agregar diversas possibilidades de uso na prevenção ou diagnósticos de doenças. A tecnologia está baseada na versatilidade de conjugação por reações interfaciais de ligantes conhecidos em sítios específicos de ligação na nanopartícula. Diferentes espécies moleculares ou macromoleculares de origem sintética,

biossintética ou natural portando diversas funcionalidades como aminas, ácidos carboxílicos, fenóis, cetonas, aldeídos, tióis, sulfetos, derivados aromáticos, porfirinas, sacarídeos, polissacarídeos, lipídios, peptídeos, proteínas, enzimas, anticorpos, fragmentos de anticorpos, possibilita o reconhecimento do complexo por moléculas ou antígenos específicos. Estas possibilidades são alcançadas pela capacidade de interação entre os íons metálicos das nanopartículas multiparedes com os grupamentos hidroxila, carboxilas, aminas, cetonas, aldeídos, tióis e sulfetos presentes em inúmeras moléculas.

A conjugação de nanocápsulas multiparede com anticorpos ou fragmentos de anticorpos, por exemplo, leva a uma nanocápsula multiparede decorada, sendo um elaborado captador de diversos antígenos, o que torna esta tecnologia única como prevenção ou diagnóstico de doenças. Como plataforma tecnológica, a versatilidade dessas nanocápsulas multiparede complexadas com metais ou íons metálicos abre novas fronteiras para a decoração de superfície de colóides nanotecnológicos, obtidos seja por métodos *top-down* ou *bottom-up*, produzindo-se nanopartículas funcionalizadas ou multifuncionalizadas de forma rápida, sem necessidade de purificação e sem gerar resíduos. A inovação é baseada em princípios das tecnologias limpas.

O presente invento trata do desenvolvimento de nanopartículas, mais especialmente nanocápsulas, formadas por múltiplas paredes e complexadas com metais ou íons metálicos a serem decoradas com moléculas ou macromoléculas de origem sintética, biossintética ou natural. Dito sistema nanoparticulado sendo uma plataforma nanoestruturada na ligação por reação interfacial de moléculas, como é o caso de peptídeos, pequenas moléculas, proteínas, enzimas, anticorpos e fragmentos de anticorpos. O objetivo é de que esse processo sintético seja utilizado

para produzir nanocápsulas multiparede decoradas. O uso dessas nanocápsulas em métodos diagnósticos das mais diversas doenças é uma inovação para o monitoramento ou detecção de moléculas específicas, como antígenos, anticorpos ou marcadores específicos.

5 Descrição dos desenhos

– A figura 1 representa a distribuição do tamanho de partículas obtido por difração de laser (Mastersizer 2000) para (A) NC PCL e (B) NC PCL-Quitosana 0,3%. Parâmetros demonstrados por volume e número de partículas (n=3);

10 – A figura 2 representa a distribuição do tamanho de partículas obtido por difração de laser (Mastersizer 2000) para (A) NC PCL-quitosana, (B) MCMN Fe^{2+} $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (C) MCMN Fe^{2+} $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, (D) MCMN Zn^{2+} $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, (E) MCMN Zn^{2+} $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, (F) MCMN Zn^{2+} $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (G) MCMN Zn^{2+} $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todos as MCMN foram adicionadas de excesso de fenilalanina (3:1, relação molar). Parâmetros demonstrados por volume e número de partículas (n=3);

15 – A figura 3 representa a distribuição do tamanho de partículas (Z-Average) e índice de polidispersão (PDI) obtidos por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer ZS) para (A) NC PCL, (B) NC PCL-Quitosana, (C) MCMN Fe^{2+} $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ – Fenilalanina, (D) MCMN Zn^{2+} $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ – Fenilalanina, (E) MCMN Fe^{2+} $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ – Enzima ($3,99 \text{ U mL}^{-1}$), (F) MCMN Zn^{2+} $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ – scFv antiLDL(-) $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Descrição detalhada da invenção

25 Inicialmente foram sintetizadas as nanocápsulas multiparedes. O revestimento com quitosana representava elemento chave nesta construção, uma

vez que, permitiria a futura adsorção de ligantes metálicos em seus grupamentos aminas livres. Diferentes concentrações de quitosana foram avaliadas: 0,3; 0,5; 1 e 2%. Todas foram avaliadas inicialmente quanto à distribuição do tamanho de partículas e polidispersidade (SPAN) por difração de laser. Sendo que nas concentrações de quitosana de 0,5; 1 e 2% havia desestabilização da formulação com conseqüente aparecimento de distribuições micrométricas. Porém, quando 0,3% de quitosana eram adicionados, obtivemos somente uma única população nanométrica, com cerca de 10 a 15 nm maior do que antes do revestimento (figura 1). Observamos que o diâmetro médio em volume das partículas ($D[4,3]$) e a polidispersão (SPAN) foram respectivamente: NC PCL 119 nm e 0,88 e para NC PCL-Quitosana 134 and 0,96.

Posteriormente foi analisada a diferença de potencial elétrico no plano de cisalhamento das partículas (potencial Zeta) por meio da análise da mobilidade eletroforética (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK). Obtivemos um potencial zeta (milivolts – mV) negativo antes do revestimento ($-15,1 \pm 1,05$ mV) devido basicamente à presença de cargas negativas ocasionada da lecitina e a posterior inversão para valores positivos ($+ 9,3 \pm 2,54$ mV) quando do revestimento com o polímero catiônico, quitosana. Somente um único pico de distribuição de cargas foi identificado, o que garante uma homogeneidade no revestimento do sistema.

Posteriormente íons metálicos ferro e zinco foram adsorvidos sobre as nanocápsulas multiparedes. Foram testadas concentrações de Zn^{2+} de 10, 25, 50 e 100 $\mu g mL^{-1}$ e de Fe^{2+} de 50 e 100 $\mu g mL^{-1}$. Como agente de decoração, utilizamos o aminoácido fenilalanina em excesso (proporção molar 3:1 fenilalanina:MCMN). Observamos através da difração de laser a manutenção da distribuição nanométrica

quando concentrações de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Fe^{2+} ou 10 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Zn^{2+} foram testadas (figura 2).

Uma vez sintetizadas as MCMN adsorvidas de íons metálicos, utilizamos dois produtos, MCMN Zn^{2+} $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MCMN Fe^{2+} $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, em ensaios de 5 decoração com diferentes ligantes (figura 3). O complexo MCMN Fe^{2+} $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou bons resultados para a ligação do aminoácido fenilalanina e da enzima. Testamos diferentes faixas de concentrações para esta enzima, sendo elas representadas por unidades enzimáticas conjugadas ao complexo (0,09; 0,99; 3,99; 9,97 e $19,9 \text{ U mL}^{-1}$). Observamos a manutenção de um perfil nanométrico unimodal 10 até a concentração de $3,99 \text{ U mL}^{-1}$.

Já o complexo MCMN Zn^{2+} $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi decorado com fenilalanina e com fragmentos de anticorpos de cadeia única anti-LDL modificada [scFv anti-mLDL]. Testamos as concentrações de 25, 50, 100, 200 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de scFv anti-mLDL (Tabela 1). Observamos gradativo aumento do tamanho médio na medida em que 15 maiores concentrações de scFv anti-mLDL eram conjugadas ao complexo nanoparticulado. Após esta etapa, utilizamos o sistema MCMN – scFv anti-mLDL em testes de captação com lipoproteínas LDL modificada (mLDL) e LDL Nativa (não modificada) (Tabela 1). Verificamos que quando a LDL modificada era adicionada, havia uma ligação específica entre esta lipoproteína e o complexo contendo o 20 fragmento de anticorpo. Por sua vez, quando LDL nativa foi adicionada, não houve aumento de tamanho do sistema MCMN-scFv anti-mLDL.

Assim, a formação do complexo proposto para reconhecer mLDL teve seu objetivo alcançado, uma vez que também não houve bloqueio do sítio específico de ligação ao antígeno no fragmento de anticorpo após sua conjugação com o MCMN 25 Zn^{2+} $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. As novas nanocápsulas multiparede decoradas com scFv anti-

mLDL mostraram-se específicas para ligação com mLDL, apresentando aplicação no diagnóstico de doenças relacionadas com a aterosclerose.

Amostra	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) - Zetasizer	
	Z-average (nm)	PDI
LNC-PCL	110	0,14
LNC-PCL-CS	121	0,14
MCMN-scFv 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	122	0,16
MCMN-scFv 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	125	0,17
MCMN-scFv 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	130	0,20
MCMN-scFv 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	178	0,21
MCMN-scFv 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	426	0,10
MCMN-scFv 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDL	205	0,10
MCMN-scFv 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDL	359	0,23
MCMN-scFv 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDL	403	0,26
MCMN-scFv 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDL	490	0,23
MCMN-scFv 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDL	469	0,21
MCMN-scFv 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDLnativa	121	0,18
MCMN-scFv 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDLnativa	129	0,22
MCMN-scFv 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDLnativa	127	0,18
MCMN-scFv 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDLnativa	216	0,19
MCMN-scFv 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LDLnativa	434	0,20

Tabela 1. Avaliação do tamanho médio de partículas (Z-average) e índice de polidispersão (PDI) através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Zetasizer ZS) para o complexo MCMN Zn^{2+} 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após reação com diferentes concentrações de scFv anti-mLDL para decorar as MCMN e verificação da ligação específica com a lipoproteína de baixa densidade modificada (mLDL) e com a nativa (LDLnativa).

Os complexos metálicos adsorvidos em nanocápsulas multiparedes representadas pela sigla MCMN constituem um produto para ligação superficial de moléculas ou macromoléculas como é o caso peptídeos, enzimas, anticorpos, fragmentos de anticorpos e pequenas moléculas. Essa síntese possibilita

modernizar técnicas diagnósticas, e a obtenção de novos produtos uma vez que possibilitam a complexação de substâncias específicas pela sua coordenação em sítios específicos das nanocápsulas multiparede. Uma exemplificação da utilização das MCMN e a possibilidade de ligação específica com substâncias moleculares, macromoleculares ou fragmentos de anticorpos anti-mLDL em uma região molecular conhecida do fragmento e sem agravos para a especificidade de ligação ao antígeno.

Este sistema MCMN é constituído de uma nanocápsula de núcleo lipofílico revestida por um sistema multiparede. Estas paredes possuem em sua constituição um polímero lipofílico, emulsionante ou tenso-ativo, um tensoativo não-iônico, um tensoativo iônico e um polímero iônico, como por exemplo: poli(epsilon-caprolactona), polissorbato 80, lecitina e quitosana. O revestimento do núcleo lipofílico ocorre com a deposição do polímero lipofílico e revestimento com os tensoativos não-iônico e iônico ou emulsionantes ou poloxamers. Em seguida a ligação do polímero iônico, quitosana, ocorre por interações eletrostáticas e, finalizando, a complexação com metais ou íons metálicos, por exemplo de ferro (Fe^{2+}) ou zinco (Zn^{2+}) proporciona a presença de sítio específicos para a ligação superficial de diferentes moléculas através da coordenação com grupamentos químicos contendo oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre como hidroxilas, carboxilas, carbonilas, aminas, amidas, histidinas, piridinas e outros compostos heterocíclicos, carbamatos, tiocarmabatos ou tiol, sulfetos, sulfonamidas, sulfonas, sulfóxidos, sulfatos, fosfinas, fosfonatos ou fosfatos, carboxilatos, oximas, heterociclos, entre outras, como histidina.

Inicialmente foram preparadas nanocápsulas de núcleo lipídico e parede de poli(epsilon-caprolactona) através do método de deposição interfacial de polímeros

pré-formados (Jager et al., 2009). Neste método a fase orgânica composta de (PCL) poli(epsilon-caprolactona) ($MW\ 14.000\ g\ mol^{-1}$) (0,1 g) (Aldrich, França), monoestearato de sorbitano (SPAN 60[®]) (0,04 g) (Delaware, Brasil), lecitina (Lipoid S 75[®]) (0,03 g) (Lipoid[®], Alemanha), triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (0,120 g) (Alpha Química, Brasil) e acetona (25 mL) (Nuclear, Brasil) foi dissolvida em Erlenmeyer durante 1h a 40°C. Esta fase foi vertida sobre uma fase aquosa sob agitação na temperatura ambiente, contendo polissorbato 80 (Tween 80[®]) (0,08 g) (Alpha Química, Brasil) e água (50 mL). Após 10 min, a acetona foi eliminada e a fase aquosa concentrada sobre pressão reduzida com auxílio de um evaporador rotatório (Büchi, Alemanha). O volume final foi ajustado para 10 mL. Posteriormente, as nanopartículas de PCL foram revestidas com um polímero catiônico de baixa massa molar chamado quitosana (Aldrich, França). A quitosana na concentração de 0,3% havia sido previamente dissolvida durante 24h em uma solução aquosa de ácido acético a 1%. Cerca de 1 mL desta solução de quitosana foi lentamente adicionada sobre 9 mL da suspensão contendo as nanocápsulas de PCL, sendo este processo feito sobre agitação moderada (500 RPM) e assim permanecendo por 4h. Desse modo, ocorreu interação eletrostática entre as cargas negativas fornecidas pela lecitina na nanocápsula de PCL com cargas positivas presente na quitosana, formando desta maneira uma nanoestruturação multiparedes. Esta recebeu este nome porque é formada de diferentes constituintes, sendo eles, o polímero PCL, polissorbato 80, lecitina e quitosana.

Posteriormente foi feita a adsorção dos íons metálicos ferro (Fe^{2+}) ou zinco (Zn^{2+}) nas nanocápsulas multiparedes. Primeiramente, preparamos soluções padrão de $ZnCl_2$ ($1\ \mu g\ mL^{-1}$ de Zn^{2+}) e $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ($1\ \mu g\ mL^{-1}$ de Fe^{2+}). A concentração final de íons adicionados as nanocápsulas multiparedes foi de $25\ \mu g\ mL^{-1}$ de Zn^{2+} e $50\ \mu g$

mL⁻¹ de Fe²⁺. Desse modo sintetizamos um sistema nanoestruturado chamado de nanocápsulas multiparedes com complexos metálicos (*Metal Complex Multi-wall Nanocapsules* - MCMN).

Este sistema possui alta reatividade e é capaz de interagir quimicamente com diversos grupos químicos como é o caso de grupamentos contendo oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre como hidroxilas, carboxilas, carboxilatos, carbonilas, aminas, amidas, histidinas, piridinas e outros compostos heterocíclicos, carbamatos, oximas, tiocarbamatos ou tiol, sulfetos, sulfonamidas, sulfonas, sulfóxidos, sulfatos, heterociclos, fosfinas, fosfonatos ou fosfatos, entre outras funções. Esta alta reatividade pode também comprometer sua estabilidade, por isso, se faz necessário em 2 min após a adsorção dos íons a adição de um agente de ligação a estes MCMN que devem estar sob agitação magnética (500 RPM). Como exemplo da utilização de agentes de decoração e conseqüentemente estabilizadores destes complexos, podem ser utilizadas substâncias orgânicas como ácidos carboxílicos, aminas, peptídeos, especialmente aminoácidos, por exemplo fenilalanina, enzimas, por exemplo proteases ou enzimas lisossomais e também fragmentos de anticorpos como por exemplo aqueles scFv anti-mLDL que reconhecem lipoproteína de baixa densidade (LDL) minimamente oxidada. Independente destes exemplos testados, inúmeras são as moléculas que podem reagir e decorar o sistema MCMN, uma vez que, a reação pode ocorrer com qualquer molécula que disponha dos grupamentos químicos citados acima disponíveis para a ligação.

O sistema MCMN composto de íons ferro ou zinco é capaz de agregar diversas possibilidades de uso. Seus íons são capazes de complexar diversas moléculas, uma vez que, possuem elevada capacidade de interação com funcionalizações orgânicas presentes em inúmeras moléculas.

O modo de ligação superficial entre os íons metálicos e os grupamentos químicos presente nos ligantes é de fácil padronização, diferentemente de outros tipos de ligações químicas que necessitam de reagentes específicos, elevado tempos de reações, além de gerarem em alguns casos resíduos tóxicos que devem ser removidos e tratados para evitar impacto ao meio ambiente.

A ligação superficial, através de reações interfaciais, com ligantes conhecidos, como pequenas moléculas, sacarídeos, aminoácidos, enzimas, anticorpos ou fragmentos de anticorpos, peptídeos ou proteínas, possibilita a decoração da superfície originando produtos inovadores.

O seu uso com anticorpos possibilita termos um elaborado captador de antígenos específicos, o que possibilita aperfeiçoar métodos preventivos e de diagnóstico de doenças mediadas por estes antígenos.

A síntese de MCMN é de fácil execução, proporciona ligações estáveis com seus ligantes, além de ser um sistema nanométrico com diâmetros de partículas entre 10 nanômetros e 10 micrometros. MCMN são caracterizadas por diâmetros médios ($D[4,3]$) na faixa de 50 nanômetros e 5 micrometros e polidispersão (SPAN) na faixa de 0,5 e 5,0.

O sistema MCMN ferro (Fe^{2+}) ou Zinco (Zn^{2+}) poderá ser utilizado principalmente no diagnóstico de aterosclerose, e como carregador de moléculas ou macromoléculas de origem sintética, biossintética ou natural, especialmente proteínas e enzimas, como transportador de ligantes, moléculas ou de aminoácidos como a fenilalanina e/ou no desenvolvimento de modernos métodos diagnósticos na indústria biomédica. Um primeiro exemplo de um produto é a suspensão de nanocápsulas multiparede revestidas com scFv a ser utilizado na prevenção ou diagnóstico de doenças transmissíveis e não transmissíveis. Um segundo exemplo

de produto é a suspensão de nanocápsulas multiparede revestidas com enzimas, relacionadas com alguma deficiência enzimática. E, ainda, um terceiro exemplo de produto é a suspensão de nanocápsulas multiparede revestidas com protease com aplicação na terapia de câncer ou na debridação de tecidos.

5 Também é um sistema capaz de conjugação com compostos presentes no meio ambiente e deste modo tem importante função como identificador de moléculas ambientais tais como poluentes, resíduos e agrotóxicos.

Deve ficar evidente aos conhecedores da técnica que a presente invenção pode ser configurada de muitas outras formas específicas sem apartar-se do espírito
10 ou do escopo da invenção. Particularmente, deve-se compreender que a invenção pode ser configurada nas formas descritas.

Portanto, os exemplos e configurações presentes devem ser considerados como ilustrativos e não restritivos, e a invenção não deve ser limitada aos detalhes fornecidos neste documento, mas podem ser modificados dentro do escopo e
15 equivalência das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO DE NANOCÁPSULAS

MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS, produzindo

nanocápsulas multiparedes decoradas baseado na quimissorção em sítio específico

através da coordenação versátil de diversas funções no centro metálico sem

produção de resíduos tóxicos **caracterizado** pela ligação se dar por reação

interfacial dos sítios metálicos com moléculas ou macromoléculas de origem

sintética, biossintética ou natural e pela capacidade das nanocápsulas multiparedes

ligarem quimicamente, individualmente ou em combinação, sítios metálicos que se

ligam quimicamente, individualmente ou em combinação, com os grupamentos

contendo oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre como hidroxilas, carboxilas,

carboxilatos, carbonilas, aminas, amidas, histidinas, piridinas e outros compostos

heterocíclicos, carbamatos, oximas, tiocarbamatos ou tiol, sulfetos, sulfonamidas,

sulfonas, sulfóxidos, sulfatos, heterociclos, fosfinas, fosfonatos ou fosfatos,

presentes em inúmeras moléculas.

2. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,

caracterizadas por serem formadas por núcleo, múltiplas paredes e complexadas com metais ou íons metálicos.

3. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,

de acordo com as reivindicações 2, **caracterizadas** por serem decoradas com

moléculas, macromoléculas ou biomoléculas de origem sintética, biossintética ou

natural, para aperfeiçoar produtos empregados em Saúde, incluindo doenças

genéticas, câncer, inflamação e doenças degenerativas.

4. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,

de acordo com as reivindicações 2 e 3, **caracterizadas** por serem sintetizadas como

nanocápsulas formadas por um núcleo lipofílico e revestimento de emulsionante, tensoativos não iônicos, tensoativos iônicos, polímeros lipofílicos ou hidrofílicos, polímeros iônicos, catiônicos ou aniônicos complexadas com metais ou íons metálicos.

5 **5. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,**
de acordo com as reivindicações 3 e 4, **caracterizadas** pelas nanocápsulas terem perfil granulométrico apresentando diâmetros de partículas entre 10 nanômetros e 10 micrômetros.

10 **6. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,**
de acordo com as reivindicações 3, 4 e 5, **caracterizadas** pelas nanocápsulas terem um diâmetro médio (D[4,3]) na faixa de 50 nanômetros e 5 micrômetros e polidispersão (SPAN) na faixa de 0,5 e 5,0.

15 **7. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,**
de acordo com as reivindicações 3, 4, 5 e 6, **caracterizadas** por possuírem distribuição unimodal com diâmetros médios na faixa nanoscópica medido por difração de laser.

8. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,
de acordo com a reivindicação 6, **caracterizadas** pelas nanocápsulas apresentarem diâmetros entre 40 nanômetros e 4 micrômetros.

20 **9. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,**
de acordo com as reivindicações 6, 7 e 8, **caracterizadas** pelas nanocápsulas terem um diâmetro médio (D[4,3]) na faixa de 50 nanômetros e 1 micrometro.

25 **10. NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS,** **caracterizadas** por serem nanoestruturadas para funcionalização de superfície pela ligação de moléculas e/ou macromoléculas como é o caso de

pequenas moléculas de origem natural ou sintética, aminoácidos, sacarídeos, lipídeos, e como peptídeos, enzimas, proteínas, anticorpos e fragmentos de anticorpos originando sistemas nanoparticulados funcionalizados ou multifuncionalizados.

5 11. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizadas** por possibilitarem a coordenação de substâncias em sítios específicos das nanocápsulas multiparede através de ligações de coordenação.

10 12. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações 10 e 11, **caracterizadas** pela capacidade de ligações de coordenação de moléculas superficiais para atuarem como ligantes específicos das nanocápsulas multiparedes com aplicação em diferentes setores econômicos como o petroquímico, o de biocombustível, o agroquímico, o cosmético e higiene pessoal, e mais especialmente o farmacêutico.

15 13. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizadas** pela presença de moléculas ou macromoléculas superficiais para complexarem em sítios específicos de outras moléculas, macromoléculas, receptores, enzimas ou estruturas celulares atuando como produtos de diagnóstico de doenças.

20 14. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizadas** por serem constituídas de nanocápsulas de núcleo lipofílico revestidas por um sistema multiparede, sendo que essas paredes possuem em sua constituição um polímero lipofílico, dois tensoativos, ou um tensoativo e um emulsionante, e um
25 polissacarídeo.

15. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações 4 e 17, **caracterizadas** por serem constituídas de nanocápsulas de núcleo lipofílico revestidas por um sistema multiparede, sendo que essas paredes possuem em sua constituição polímeros lipofílicos, emulsionantes e tensoativos como poliésteres, poloxamers, derivados do sorbitano, fosfolípídeos e polissacarídeos, especialmente poli(epsilon-caprolactona), polissorbato 80, lecitina e quitosana.

16. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações 4, 17 e 18, **caracterizadas** pelo revestimento do núcleo lipofílico ocorrer com a deposição do polímero lipofílico, revestimento com polissorbato 80 e lecitina, seguido da quitosana por interações eletrostáticas e, finalizando com a complexação com metais ou íons metálicos.

17. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade dos sítios metálicos interagirem com aminoácidos ou resíduos de aminoácidos.

18. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade dos sítios metálicos interagirem com peptídeos ou proteínas.

19. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade dos sítios metálicos interagirem com enzimas ou receptores.

20. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade dos sítios metálicos interagirem com derivados de amina.

21. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade dos sítios metálicos interagirem com compostos contendo átomos nucleofílicos como os nitrogenados.
- 5 22. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade dos sítios metálicos interagirem com enzimas proteolíticas ou lisossomais.
23. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade
10 dos sítios metálicos interagirem anticorpos ou fragmentos de anticorpos.
24. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pela capacidade dos fragmentos de anticorpos coordenados nas nanocápsulas multiparedes se ligarem especificamente aos antígenos específicos.
- 15 25. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações 1 e 27, **caracterizadas** pela capacidade das nanocápsulas multiparede decoradas com fragmentos de anticorpos se ligarem especificamente aos antígenos formando um complexo caracterizado pelo aumento de diâmetro médio.
- 20 26. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações 1, 27 e 28, **caracterizadas** pela capacidade das nanocápsulas multiparede decoradas com enzimas formando um complexo caracterizado pelo aumento de diâmetro médio.
- 25 27. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações 1, 27, 28 e 29, **caracterizadas** pela

capacidade das nanocápsulas multiparede decoradas com fragmentos de anticorpos se ligarem especificamente ao antígeno.

5 28. **NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizadas** pela presença de um núcleo lipofílico capaz carregar substâncias de origem natural, biossintética ou sintética, como fármacos, ativos cosméticos ou agroquímicos.

10 29. **USO DAS NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado** como insumo de formulações farmacêuticas, insumo de produtos diagnóstico, insumo de cosméticos ou como insumo de produtos agroquímicos.

30. **USO DAS NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado** como identificador de moléculas ambientais tais como poluentes, resíduos e agrotóxicos.

15 31. **USO DE NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado** como insumo em formulações farmacêuticas.

32. **USO DE NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado** como insumo em kits diagnóstico.

20 33. **USO DE NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS**, de acordo com as reivindicações anteriores, **caracterizado** como agentes de diagnóstico pela capacidade das nanocápsulas multiparede serem decoradas com fragmentos de anticorpos de cadeia única anti-LDL modificada.

PROCESSO SINTÉTICO PARA A PRODUÇÃO E USO DE NANOCÁPSULAS MULTIPAREDES COMPLEXADAS COM ÍONS METÁLICOS

A presente invenção trata do processo sintético para a produção de nanopartículas multiparedes complexadas com metais ou íons metálicos, como por exemplo metais alcalinos ou alcalino terrosos, metais de transição ou terras raras, incluindo prata, ouro, platina, cobre, cádmio, cobalto, paládio, mais especialmente ferro ou zinco, que permite a ligação de pequenas moléculas, macromoléculas ou biomoléculas de origem sintética, biossintética ou natural, como, por exemplo, proteínas, peptídeos, fenóis, aminas, ácidos carboxílicos, 5 sacarídeos, alcalóides, ácidos ribonucléicos ou desoxirribonucléicos, aptameros, anticorpos, anticorpos monoclonais e especialmente aminoácidos, proteínas, enzimas e fragmentos de anticorpos, constituindo uma inovação para o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados com superfície funcionalizada ou multifuncionalizada. A invenção prevê o uso do processo 10 sintético para a funcionalização da superfície coloidal produzindo nanopartículas multiparedes decoradas, sendo que as nanocápsulas multiparede decoradas podem ser usadas para o diagnóstico de doenças na área da saúde, como por exemplo terapia genética, câncer, inflamação, doenças degenerativas.