



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

(21) BR 102014017316-1 A2

(22) Data do Depósito: 14/07/2014

(43) Data da Publicação: 23/02/2016
(RPI 2355)



(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E SEU USO

(51) Int. Cl.: A61K 9/51; A61K 47/12; A61K 47/14; A61P 35/00; B82Y 5/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): ROBERTA BALANSIN RIGON, NAIARA FACHINETTI, MARLUS CHORILLI, PATRÍCIA SEVERINO, MARIA HELENA ANDRADE SANTANA

(74) Procurador(es): FABIÓLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, NANOPARTÍCULAS LIPIDICAS SÓLIDAS E SEU USO. A presente invenção descreve um processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas com trans-resveratrol (RES) por sonicação, utilizando lipidio peguado, bem como as nanopartículas obtidas e seu uso na terapia antitumoral do melanoma. -

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS,
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E SEU USO**

Campo da invenção:

[001] Esta invenção se insere na área da nanotecnologia e na área farmacêutica e descreve um processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas com *trans*-resveratrol (RES), bem como as nanopartículas obtidas.

[002] Ainda, esta invenção descreve o uso das referidas nanopartículas na terapia antitumoral do melanoma.

Fundamentos da invenção:

[003] A exposição à radiação solar ultravioleta (UV) é um fator muito importante para a patogênese de várias doenças cutâneas, incluindo o envelhecimento cutâneo, as hiperpigmentações e o câncer de pele.

[004] A radiação UV pode ser dividida em 3 espectros: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (< 280 nm), em que a UVC, até o presente momento, é absorvida pela camada atmosférica de ozônio e não atinge a superfície da Terra.

[005] A radiação UVA penetra na epiderme, chegando até a derme, onde induz a formação de oxigênio singlete e radicais livres, que podem causar danos às macromoléculas celulares como proteínas, lipídeos e DNA. A radiação UVB pode induzir a uma variedade de efeitos biológicos, incluindo inflamação, formação de queimaduras solares, hiperpigmentação, alterações imunológicas e indução do estresse oxidativo, que, quando associados, podem promover a formação do câncer de pele.

[006] Sabe-se que a incidência do câncer de pele tem apresentado um grande aumento nas últimas décadas, o qual está intimamente relacionado com aumento da exposição

solar. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no Brasil, correspondendo a até 25% de todos os tumores malignos registrados no país.

[007] Existem basicamente dois tipos de câncer de pele: o não melanoma, que é o mais comum e raramente pode causar a morte do paciente; e o melanoma, que é o mais raro, mas é responsável por três em cada quatro mortes por câncer de pele. Os melanomas são originados através de alterações nos melanócitos.

[008] Estudos recentes têm demonstrado que o *trans*-resveratrol (denominado (*trans*-3, 4', 5-trihidroxistilbeno) ou RES), que apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, atua como um importante aliado na prevenção e no tratamento de desordens cutâneas, tal como a carcinogênese.

[009] Este composto naturalmente encontrado em uvas e em outras plantas medicinais apresenta vários efeitos benéficos para a saúde, dentre eles: ação cardioprotetora, que inclui supressão da peroxidação lipídica e da síntese de eicosanoides, inibição da agregação plaquetária, ações antioxidante, anti-inflamatória e vasorelaxante.

[010] Um dos maiores desafios atualmente enfrentados pelos pesquisadores é a baixa biodisponibilidade *in vivo* do RES quando administrado por via oral. Em mamíferos, esta substância sofre metabolização hepática e intestinal rápida, logo, sua utilização sistêmica é prejudicada, uma vez que o pico plasmático diminui rapidamente.

[011] Estudos demonstram que o RES induz a apoptose de células de melanoma *in vitro*, no entanto, ao administrá-lo

oralmente em ratos, não são observados efeitos no combate ao melanoma, devido à sua rápida metabolização após a sua administração.

[012] Assim, a pele pode ser considerada uma atraente via de administração de fármacos, uma vez que evita o metabolismo pré-sistêmico e a degradação de fármacos pelo sistema gastrointestinal. Todavia, ela funciona como uma barreira extremamente dificultosa de ser transposta, devido à presença do estrato córneo, que seleciona os componentes a serem permeados.

[013] Dessa forma, a administração cutânea do RES pode ser conveniente a fim de torná-lo disponível em seu local de ação. No entanto, algumas propriedades físico-químicas, tal como sua limitada solubilidade aquosa, dificultam sua eficiência terapêutica tópica, apesar dos estudos mostrarem resultados promissores na inibição da incidência do tumor e retardo do início da tumorigênese na aplicação tópica no pré e no pós-tratamento da exposição crônica à radiação UVB.

[014] Sendo assim, a presente invenção visa contornar estes problemas ao recorrer à estratégia de desenvolvimento de sistemas de liberação para este princípio ativo. Em vista disso, sistemas nanoestruturados apresentam vantagens relacionadas ao fato de promoverem liberação modificada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação.

[015] Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) consistem de um sistema carreador coloidal de fármacos que, quando aplicado topicamente, possui propriedades de interação com o estrato córneo e outras camadas da pele devido ao seu tamanho de partícula reduzido, o que possibilita maior ação

biológica de fármacos.

[016] Quando comparado com outros veículos, como, por exemplo, as emulsões, as NLSs apresentam a vantagem de controlar a liberação do fármaco, promover baixa irritação cutânea e proteger a substância ativa.

[017] A liberação mediada pelas NLS pode ser uma ferramenta auxiliar no aumento da biodisponibilidade do RES. Estudos já demonstraram que NLS contendo RES podem atravessar a membrana celular dos queratinócitos e, assim, aumentar o tempo de exposição ao RES, promovendo maior inibição do crescimento tumoral.

[018] Assim, a presente invenção propõe um processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas com RES por sonicação, utilizando lipídio peguilado, como o estearato de polioxietileno 40.

[019] Os lipídios normalmente utilizados na obtenção de NLSs não favorecem a incorporação de fármacos com variados graus de lipofilia. Ainda, tais lipídios são facilmente reconhecidos pelo sistema imune, o que os torna variáveis à ação de enzimas de degradação.

[020] A utilização de lipídios peguilados na obtenção das NLSs da invenção é extremamente interessante, pois possibilita a incorporação de fármacos com diferentes graus de lipofilicidade, além de promover uma barreira física que dificulta a ação de macrófagos que removem os componentes da formulação e diminuem o efeito desejado.

[021] Adicionalmente, as nanopartículas obtidas podem ser usadas na terapia antitumoral de melanoma.

Estado da técnica:

[022] Alguns documentos do estado da técnica descrevem

a aplicação e uso tópico de nanopartículas com diferentes finalidades.

[023] O documento EP0852941 descreve uma composição cosmética na forma de uma nanodispersão, compreendendo um óleo solúvel, um éster de ácido graxo, um fosfolipídio essencialmente puro, etanol próprio para aplicação tópica e água.

[024] O documento WO9721428 se refere a uma suspensão farmacêutica de nanopartículas de hidrocortisona para aplicação tópica, em que o agente ativo está disperso em um éster de ácido graxo e outros agentes auxiliares, como lecitina e óleo neutro.

[025] O documento PI0411954-1 descreve nanopartículas de derivados poli-oxietilenados com tamanho inferior a 1 µm, as quais compreendem um polímero biodegradável, um copolímero de bloco derivado de polioxietileno e pelo menos um ingrediente farmacêuticamente ou cosmeticamente ativo. Às nanopartículas podem ser incorporados princípios ativos diversos, selecionados dentre moléculas com propriedades terapêuticas, vacinas e cosméticos.

[026] Nenhum dos documentos do estado da técnica descreve nanopartículas lipídicas sólidas compreendendo RES para uso na terapia antitumoral de melanoma.

Breve descrição da invenção:

[027] A presente invenção se refere a um processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas com *trans*-resveratrol (RES) por sonicação, bem como as nanopartículas obtidas.

[028] Ainda, esta invenção descreve o uso das referidas nanopartículas na terapia antitumoral de melanoma.

Breve descrição das figuras:

[029] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se fazem referências, conforme se segue.

[030] A figura 1 representa a média e desvio padrão do diâmetro médio (nm) das nanopartículas preparadas através da sonicação e analisadas 24 horas, T15, T30, T45 e T60 dias após o preparo.

[031] A figura 2 representa a distribuição do diâmetro médio por intensidade das nanopartículas analisadas no tempo de 24 horas após o preparo.

[032] A figura 3 representa a distribuição do diâmetro médio por intensidade das nanopartículas analisadas no tempo de 60 dias após o preparo.

[033] A figura 4 é uma fotomicrografia da nanopartícula 1 com um aumento de 50.000 vezes.

[034] A figura 5 é uma fotomicrografia da nanopartícula 5 com um aumento de 100.000 vezes.

[035] A figura 6 é uma fotomicrografia da nanopartícula 2 com um aumento de 80.000 vezes.

[036] A figura 7 é uma fotomicrografia da nanopartícula 6 com um aumento de 150.000 vezes.

[037] A figura 8 é uma fotomicrografia da nanopartícula 3 com um aumento de 150.000 vezes.

[038] A figura 9 é uma fotomicrografia da nanopartícula 7 com um aumento de 150.000 vezes.

[039] A figura 10 é uma fotomicrografia da nanopartícula 4 com um aumento de 150.000 vezes.

[040] A figura 11 é uma fotomicrografia da nanopartícula 8 com um aumento de 200.000 vezes.

[041] A Figura 12 é um termograma de aquecimento das matérias-primas utilizadas no preparo das nanopartículas.

[042] A Figura 13 é um termograma da mistura física do ácido esteárico com o RES (aquecimento).

[043] A Figura 14 é um termograma da mistura física do estearato de polioxietileno com o RES (aquecimento).

[044] A Figura 15 é um termograma da mistura física do copolímero tribloco com o RES (aquecimento).

[045] A Figura 16 é um termograma da mistura física da fosfatidilcolina de soja com o RES (aquecimento).

[046] A Figura 17 é um termograma da nanopartícula 1 após os 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e reaquecimento).

[047] A Figura 18 é um termograma da nanopartícula 5 após os 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e reaquecimento).

[048] A Figura 19 é um termograma da nanopartícula 2 após os 3 ciclos de análise (aquecimento, resfriamento e reaquecimento).

[049] A Figura 20 é um termograma da nanopartícula 6.

[050] A Figura 21 é um termograma da nanopartícula 3.

[051] A Figura 22 é um termograma da nanopartícula 7.

[052] A Figura 23 é um termograma da nanopartícula 4.

[053] A Figura 24 é um termograma da nanopartícula 8.

[054] A Figura 25 é o perfil de liberação de RES nas nanopartículas lipídicas sólidas 5, 6, 7 e 8 após 24 horas de análises.

[055] A Figura 26 é um cromatograma obtido com injeção de solução de *trans*-resveratrol após sua extração da pele suína (derme + epiderme).

[056] A Figura 27 é um cromatograma obtido com injeção de solução de *trans*-resveratrol após sua extração da pele suína (estrato córneo).

Descrição detalhada da invenção:

[057] As nanopartículas lipídicas sólidas da invenção compreendem:

- 5,0% de material graxo selecionado dentre ácido esteárico ou estearato de polioxietileno 40;
- tensoativo selecionado dentre 3,5% copolímero tribloco ou mistura de 3,5% copolímero tribloco e 1,2% fosfatidilcolina de soja;
- conservantes microbiológicos selecionados dentre uma mistura de 0,18% metilparabeno e 0,02% propilparabeno; e
- 0,1% fármaco, especificamente, o *trans*-resveratrol (RES).

[058] Em uma modalidade preferida desta invenção, o copolímero tribloco é copolímero de polipropileno glicol flanqueado por dois blocos de polietileno glicol.

[059] Em uma modalidade preferida da invenção, as nanopartículas com RES apresentam diâmetro médio de 16,5 a 167 nm e índice de polidispersidade de 0,140 a 0,368, preferencialmente 0,200. O potencial zeta varia de -2,58 a -2,66 mV. Os valores variam de acordo com a concentração dos componentes da nanopartícula.

[060] As nanopartículas lipídicas sólidas com *trans*-resveratrol (RES) desta invenção foram obtidas por meio do processo que compreende as etapas de:

- a. preparo da pré-emulsão;
- b. sonicação da mistura;
- c. centrifugação da mistura.

[061] Na etapa "a", para o preparo da pré-emulsão, a fase aquosa, a qual compreende o copolímero tribloco, é aquecida a uma temperatura que varia de 70 a 80 °C, preferencialmente 75 °C.

[062] Em seguida, a fase aquosa é vertida sobre a fase oleosa, a qual compreende o material graxo associado ou não à fosfatidilcolina de soja e adicionado do fármaco, sob mesma temperatura.

[063] A mistura é agitada sob aquecimento durante um intervalo de tempo que varia de 1 a 2 minutos, preferencialmente 1 minuto.

[064] Em seguida, na etapa "b", a mistura formada é sonicada durante 20 minutos, em amplitude que varia de 46 a 48%, preferencialmente 47%, e potência que varia de 490 a 510 W, preferencialmente 500 W, sendo as amostras mantidas em banho de gelo.

[065] Testes preliminares demonstraram que o banho de gelo promove a formação de partículas com diâmetro e índice de polidispersidade menores do que quando utilizado banho de água a temperatura ambiente.

[066] Na etapa "c", promove-se a centrifugação a uma rotação que varia de 4000 a 6000 rpm, preferencialmente 5000 rpm, durante um intervalo de tempo que varia de 9 a 11 minutos, preferencialmente 10 minutos.

[067] A centrifugação permite eliminar o titânio que pode ser desprendido durante o processo de sonicação. Por fim, as nanopartículas lipídicas sólidas com trans-resveratrol (RES) foram caracterizadas físico-química e microscopicamente.

[068] As nanopartículas obtidas podem ser usadas na

terapia antitumoral de melanoma.

- Caracterização físico-química das nanopartículas da invenção:

[069] Para avaliação da estabilidade física, as nanopartículas foram avaliadas quanto ao diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta, bem como por calorimetria e microscopicamente.

[070] Para isso, foram preparados quatro (4) tipos de nanopartículas, com diferentes concentrações, conforme mostrado na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1 - Nanopartículas desenvolvidas.

	Material Graxo		Tensoativo		Conservante microbiológico		Fármaco
	Ácido Esteárico	Estearato de Polioxietileno	Fosfatidilcolina de Soja	Copolímero Tribloco	MP	PP	RES
1	5,0	-	-	3,5	0,18	0,02	-
2	5,0	-	1,2	3,5	0,18	0,02	-
3	-	5,0	-	3,5	0,18	0,02	-
4	-	5,0	1,2	3,5	0,18	0,02	-
5	5,0	-	-	3,5	0,18	0,02	0,1
6	5,0	-	1,2	3,5	0,18	0,02	0,1
7	-	5,0	-	3,5	0,18	0,02	0,1
8	-	5,0	1,2	3,5	0,18	0,02	0,1

Em que: MP = metilparabeno

PP = propilparabeno

- Determinação do diâmetro médio e polidispersidade das NLSS:

[071] As nanopartículas foram analisadas quanto ao seu diâmetro médio e seu índice de polidispersidade por meio da técnica de espectroscopia de correlação de fótons ou

espalhamento de luz dinâmico (DLS).

[072] Verificou-se que, em relação ao diâmetro médio das partículas (Figura 1), aquelas preparadas com estearato de polioxietileno acrescidas ou não de RES (3, 4, 7 e 8) foram as que apresentaram menor diâmetro médio, quando analisadas 24 horas após o preparo.

[073] Todas as nanopartículas testadas não demonstraram estabilidade em relação ao diâmetro médio, pois sofreram alterações durante os 60 dias de análise.

[074] Embora tenham sido observadas alterações no diâmetro médio das partículas durante o armazenamento, não foram observadas alterações organolépticas e macroscópicas nos 60 dias de estudo.

[075] Como é possível observar na Figura 1, as nanopartículas 1, 2, 5 e 6 apresentaram aumento de duas vezes no diâmetro médio inicial. As nanopartículas 3 e 7 sofreram variações de até nove vezes no diâmetro médio e as nanopartículas 4 e 8 apresentaram, após 15 dias, aumento de duas e três vezes do diâmetro inicial, respectivamente.

[076] Verificou-se, ainda, que as nanopartículas 1, 2, 5 e 6, após 60 dias de armazenamento, apresentaram redução no diâmetro médio das partículas quando comparado com demais tempos, sendo que este evento pode estar relacionado à precipitação das partículas de diâmetro maior, sendo detectadas apenas partículas menores.

[077] Pelas Figuras 2E, 2F, 2G e 2H, verifica-se que as nanopartículas 3, 7, 4 e 8, respectivamente, apresentaram ampla distribuição no diâmetro médio por intensidade no tempo 24 horas após o preparo, indicando presença de mais de uma população de partículas. Isso pode indicar a

presença de uma mistura de estruturas, como NLS e micelas.

[078] O mesmo não ocorreu para as 1, 5, 2 e 6, conforme observado na Figura 2A, 2B, 2C e 2D, respectivamente, sendo que as nanopartículas apresentaram distribuição homogênea, indicando a predominância de uma população de tamanho de partícula.

[079] Após estocagem por 60 dias, pode-se verificar, na Figura 3, que todas as nanopartículas apresentaram ampla distribuição no diâmetro médio, indicando que, durante o armazenamento, pode ter ocorrido aglomeração das partículas presentes.

[080] O índice de polidispersidade é um parâmetro para definir a distribuição do tamanho das partículas. Amostras com ampla distribuição de tamanho das partículas apresentam índice de polidispersidade superior a 0,7. Para um índice igual a 0,4, considera-se uma distribuição heterogênea e presença de aglomerados na dispersão.

[081] A Tabela 2 descreve os resultados obtidos (média e desvio padrão) do índice de polidispersidade das nanopartículas, os quais foram tratados estatisticamente.

Tabela 2 - Valores obtidos para o índice de polidispersidade das nanopartículas após 24 horas, 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo.

	T24	T15	T30	T45	T60
1	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,01
2	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,02
3	0,21 ± 0,06	0,23 ± 0,04	0,27 ± 0,07	0,37 ± 0,08	0,39 ± 0,03
4	0,37 ± 0,003	0,32 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,30 ± 0,04
5	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,01
6	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,20 ± 0,01

7	0,26 ± 0,18	0,17 ± 0,12	0,17 ± 0,02	0,29 ± 0,08	0,42 ± 0,23
8	0,37 ± 0,003	0,44 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,39 ± 0,03

[082] Pelos resultados da Tabela 2, verifica-se que as nanopartículas 1, 2, 5 e 6 apresentaram índice de polidispersidade próximo de 0,2, demonstrando partículas monodispersas.

[083] Pode-se observar também que a nanopartícula 3 apresentou índice de polidispersidade próximo à 0,2 até 45 dias após o preparo. Após esse período, observou-se aumento significativo no índice de polidispersidade, podendo indicar presença de aglomerados. O mesmo não pode ser observado para a nanopartícula 7, a qual apresentou índice de polidispersidade estável durante todo o período de estudo.

[084] A nanopartícula 4 apresentou índice estável até 45 dias de estocagem e até 30 dias para a nanopartícula 8. Porém, tais nanopartículas apresentaram valores de índice superiores a 0,3, o que indica amostra mais polidispersa, podendo causar a formação de aglomerados.

- Análise do potencial zeta:

[085] O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento adequado, sendo as análises feitas nos tempos 24 horas, 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo.

[086] A Tabela 3 descreve os resultados obtidos para a análise do potencial zeta, os quais foram tratados estatisticamente.

Tabela 3 - Valores obtidos para o potencial zeta das nanopartículas após 24 horas, 15, 30, 45 e 60 dias após o preparo.

	T24	T15	T30	T45	T60
1	-1,54 ± 0,31	-1,34 ± 0,08	-2,07 ± 1,25	-1,03 ± 0,59	-6,45 ± 1,03
2	-2,22 ± 1,12	-4,01 ± 3,55	-2,82 ± 2,02	-2,3 ± 0,64	-3,51 ± 0,75
3	-0,58 ± 0,65	-2,09 ± 0,48	-3,25 ± 0,58	-3,49 ± 0,63	-2,80 ± 0,51
4	-1,55 ± 0,37	-1,42 ± 0,38	-1,44 ± 0,42	-1,64 ± 0,38	-1,91 ± 0,10
5	-2,60 ± 1,27	-1,85 ± 0,68	-0,70 ± 0,13	-1,49 ± 0,41	-4,52 ± 3,78
6	-2,66 ± 0,33	-2,49 ± 0,39	-2,73 ± 0,96	-1,13 ± 0,20	-2,19 ± 0,99
7	-2,58 ± 1,69	-1,24 ± 0,49	-3,30 ± 1,26	-1,68 ± 0,33	-1,78 ± 0,47
8	-2,63 ± 0,79	-1,89 ± 0,42	-2,05 ± 0,14	-2,13 ± 0,25	-2,51 ± 0,21

[087] A redução no potencial zeta está relacionada com a redução da estabilidade física. Um potencial zeta de no mínimo ± 60 mV é requerido para uma excelente estabilidade e de no mínimo ± 30 mV para uma boa estabilidade física.

[088] Os resultados demonstraram que, para todas as nanopartículas obtidas, o potencial zeta é menor do que 6 mV, conforme demonstrado na Tabela 3. Desta forma, não apresentam um potencial zeta adequado para uma boa estabilização estática. A adição da substância ativa RES não promoveu alteração significativa nesse valor.

[089] Além disso, verificou-se que não houve alterações significativas no valor do potencial zeta das nanopartículas durante o tempo de estudo, com exceção apenas da formulação 3, que apresentou alteração estatisticamente significativa após 15 dias de ensaio.

- Análise microscópica das nanopartículas da invenção:

[090] A determinação da morfologia das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura empregando microscópio eletrônico de varredura de efeito de campo (MEV-FEG).

[091] As Figuras 4 a 11 demonstram as imagens obtidas

por MEV-FEG das nanopartículas 1 a 8. As fotomicrografias demonstraram a formação de nanopartículas regulares e com baixa dispersão no diâmetro médio (Figura 4 e Figura 11).

[092] As fotomicrografias obtidas não demonstraram a formação de cristais, que surgem quando o composto a ser nanoencapsulado está presente em excesso no meio de dispersão ou devido a uma grande polidispersão no tamanho das nanopartículas obtidas.

[093] Os resultados da microscopia sugerem que o método de produção por sonicação aplicado produz um material com distribuição nanométrica de partículas com morfologias bem distintas.

[094] Nas figuras, observam-se nanopartículas com diâmetros entre 20 e 150 nm, resultados um pouco menor do que os encontrados na análise de diâmetro médio pela técnica de correlação de fótons, também conhecida como espalhamento de luz dinâmico (DLS).

[095] Isso ocorre pois, durante o preparo da amostra para a análise por MEV-FEG, há a evaporação da água presente no sistema, que provoca o encolhimento das partículas de modo que o diâmetro médio determinado por MEV é menor ao determinado por DLS.

- Calorimetria diferencial exploratória (DSC):

[096] As medidas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas utilizando calorímetro diferencial de varredura (DSC) acoplado a um módulo de resfriamento por N₂.

[097] As Figuras 12 a 24 apresentam a curva de DSC das matérias-primas utilizadas na obtenção das nanopartículas, bem como a curva das nanopartículas obtidas. Para todas as

nanopartículas, foram realizadas análises nos 3 ciclos, no entanto, apenas foram representados nas figuras os ciclos que apresentaram eventos térmicos.

[098] Verificou-se que, durante o aquecimento, a fosfatidilcolina de soja não apresentou pico de fusão (Figura 12), possivelmente pelo fato da mesma não apresentar ponto de fusão aparente.

[099] Na mesma figura, a curva do copolímero tribloco apresentou evento endotérmico de fusão bem definido em 59 °C e apresentou um evento de degradação próximo a 150 °C.

[100] Os termogramas resultantes da análise do metil e propilparabenos consistem de um único evento endotérmico atribuído ao processo de fusão. Os eventos endotérmicos exibiram um pico máximo a 129 °C e 97 °C, respectivamente, correspondentes ao metilparabeno e ao propilparabeno.

[101] As misturas físicas do material graxo com o RES, bem como dos tensoativos, não apresentam pico de fusão relacionado ao RES, o que sugere que esta substância está no seu estado amorfo e não cristalino, durante a análise.

[102] Além disso, a ausência de pico de fusão pode ser decorrente da não detecção do RES pelo equipamento, uma vez que as misturas foram realizadas na proporção de matéria-prima utilizada para a realização do ensaio de DSC.

[103] Verifica-se, ainda, que não aparecem nos termogramas das nanopartículas 1 a 4 (Figura 17, Figura 19, Figura 21 e Figura 23) e 7 e 8 (Figura 22 e Figura 24) os picos endotérmicos referentes ao metilparabeno e ao propilparabeno.

[104] Em todos os termogramas das nanopartículas 1 a 4 e 5 a 8 (Figura 17 a 24), os picos endotérmicos do RES não

aparecem. Este fenômeno ocorre devido ao fato de que os mesmos se encontram em maior proporção no estado amorfo ou as altas concentrações do carreador tenham impedido a detecção dos picos de fusão destas substâncias na curva de DSC. Ainda o ácido esteárico, o estearato de polioxietileno (40) e o copolímero tribloco, por apresentarem pontos de fusão menores que o metil e o propilparabeno, poderiam dissolvê-los, impedindo a verificação de seus estados cristalinos.

[105] Nas Figuras 17 a 19, que representam o DSC das nanopartículas 1, 5 e 2, pode-se observar que a existência de eventos térmicos nos 3 ciclos de análise, sendo evidente o pico endotérmico (temperatura de fusão) no ciclo 1, bem como o pico exotérmico de recristalização no ciclo 2 e o pico de fusão após o reaquecimento no ciclo 3.

[106] Isso demonstra que, após o aquecimento e o resfriamento, as nanopartículas conseguiram retornar ao seu estado cristalino inicial. O mesmo não foi observado para as formulações 6, 3, 7, 4 e 8, as quais não apresentaram picos exotérmicos referentes a recristalização.

[107] Pode ser observado mais de um pico endotérmico para as nanopartículas 5 e 2 (Figuras 18 e 19). Ainda, uma mudança no evento térmico também pode ser observada no pico endotérmico das nanopartículas 7 e 8 (Figuras 22 e 24).

[108] Na Figura 20, correspondente à formulação 6, verifica-se um deslocamento do pico exotérmico para 106 °C, parecendo ter ocorrido um aumento no tamanho médio de estruturas cristalinas e/ou remoção de defeitos estruturais, levando a um deslocamento da primeira transição endotérmica para temperaturas mais altas.

[109] Possíveis interações entre os componentes e os diferentes adjuvantes podem ser observadas utilizando o DSC. Entretanto, diferenças entre as curvas de DSC dos componentes individuais e das misturas não necessariamente correspondem a uma incompatibilidade. Para confirmar se há incompatibilidade substancial, é importante associar outras técnicas analíticas, como, por exemplo, a termogravimetria (TG) e a termogravimetria derivada (DTG).

- Ensaios in vitro:

- Estudo de liberação do RES in vitro:

[110] A liberação do fármaco das nanopartículas pode ocorrer por três diferentes mecanismos: (a) a liberação do fármaco da superfície das nanopartículas, (b) difusão do mesmo através da matriz maleável e (c) a liberação do ativo por erosão do polímero.

[111] Os perfis de liberação do RES das nanopartículas 5, 6, 7 e 8 são demonstrados na Figura 25 e o percentual de RES liberado está representado na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Percentual de RES liberado das nanopartículas lipídicas sólidas 5, 6, 7 e 8 após 24 horas de análise.

Amostras	Liberação do RES (%) após 24 horas
5	23,92 ± 1,36
6	26,63 ± 2,52
7	13,08 ± 2,10
8	12,30 ± 1,40

[112] As nanopartículas apresentaram liberação de RES somente após 1 hora de ensaio.

[113] A Tabela 4 demonstra que as taxas de liberação do RES para as nanopartículas 5 e 6 não apresentam diferenças

estatisticamente significativas entre si, assim como ocorreu com as nanopartículas 7 e 8. Isso demonstra que a adição de fosfatidilcolina de soja na nanopartícula não apresenta influência sobre a liberação do RES.

[114] Pode-se verificar também que as nanopartículas preparadas com ácido esteárico apresentaram taxas de liberação do RES maiores do que aquelas preparadas com estearato de polioxietileno. Este resultado pode estar relacionado com o caráter mais hidrofóbico do ácido esteárico, que facilita a solubilização do RES, que é mais lipofílico e permite a sua liberação.

- Estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* do RES em peles de modelo animal:

[115] O ensaio de permeação cutânea tem como objetivo avaliar a habilidade de diferentes substâncias ativas permearem através da pele, utilizando como membrana modelo a pele da orelha de suínos ou pele humana proveniente de cirurgia plástica.

[116] O percentual de RES permeado através da pele suína após a aplicação das diferentes nanopartículas estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Percentual de RES permeado após 24 horas de análise.

Amostras	Permeação do RES (%) após 24 horas
5	45,26 ± 34,88
6	18,61 ± 16,99
7	33,76 ± 17,69
8	18,61 ± 16,99

[117] Observa-se que a quantidade de RES permeada com o

tempo aumenta para todas as nanopartículas. A quantidade média acumulada de RES permeado após 24 horas de experimento indica que as nanopartículas acrescidas de fosfatidilcolina de soja (6 e 8) apresentam menor permeação do RES quando comparado com as nanopartículas que não continham fosfatidilcolina de soja em sua formulação (5 e 7), como demonstrado na 5. Como a fosfatidilcolina é um fosfolipídio constituinte do estrato córneo, é possível que a mesma leve a um aumento no depósito do fármaco na pele.

[118] Embora as nanopartículas preparadas com estearato de polioxietileno (7 e 8) tenham apresentado menor diâmetro médio quando comparado com as nanopartículas preparadas com ácido esteárico (5 e 6), o tamanho das partículas não interferiu na permeação cutânea do RES.

[119] Nos ensaios de retenção cutânea, não detectou-se RES nas peles suínas (derme, epiderme e estrato córneo), conforme demonstrado nas Figuras 26 e 27.

[120] Os resultados demonstrados nas Figuras 26 e 27 demonstraram que, possivelmente, os métodos utilizados para a extração do RES não foram eficazes, uma vez que o RES não foi detectável em nenhum cromatograma após a extração.

- Ensaio de atividade:

- Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% do RES e NLS-RES usando tirosinase com concentração de 480 U/mL:

[121] Clinicamente, a via de síntese da melanina atua como uma ferramenta para o diagnóstico do melanoma, como, por exemplo, um marcador de diferenciação do melanoma de outros tumores. Biologicamente, a presença de melanogênese afeta o comportamento das células de melanoma e o seu

microambiente, gerando um ambiente oxidativo e alguns intermediários tóxicos e também mutagênicos.

[122] A enzima tirosinase desempenha papel primordial na melanogênese e assume, em estados patológicos, a superexpressão de melanina, o qual pode ser associado com níveis enzimáticos anormais séricos e teciduais.

[123] O resveratrol tem demonstrado ser um potente inibidor da enzima tirosinase, sendo considerado um importante aliado na terapia antitumoral de melanoma.

[124] Assim, para a determinação da concentração correspondente à atividade inibitória de 50% do RES e das nanopartículas foi utilizado tirosinase na concentração de 480 U/mL.

[125] Após o preparo das placas e a incubação das mesmas, analisaram-se as absorbâncias e, conseqüentemente, as porcentagens de inibição da tirosinase da solução de RES e do RES incorporado nas nanopartículas (NLS-RES).

[126] A fim de minimizar a influência dos componentes da formulação na atividade enzimática, utilizou-se a NLS sem RES como branco.

Tabela 6 - Porcentagem de inibição da enzima tirosinase (480 U/mL) pelo RES e pelas NLS- RES em diferentes concentrações.

Porcentagem da Inibição da Tirosinase (IA%)					
Amostras	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL	80 µg/mL
RES	47,04	63,45	74,18	68,44	73,80
5	65,49	89,78	119,88	152,75	143,55
6	55,27	58,93	73,01	105,88	108,62
7	27,11	43,78	58,56	77,46	81,59
8	39,66	55,17	65,76	71,63	79,28

[127] Conforme demonstrado na Tabela 6, tanto as soluções de RES, quanto as soluções das nanopartículas testadas (5 a 8) demonstraram atividade inibitória positiva da enzima tirosinase. Entretanto, a linearidade das curvas obtidas entre as concentrações das soluções de RES e das nanopartículas com a porcentagem de inibição da atividade da enzima tirosinase para o cálculo do IA_{50} não foram significantes, não sendo possível fazer uma análise do IA_{50} tanto para o RES em solução quanto incorporado nas nanopartículas.

[128] O ácido kójico foi adotado como controle positivo da inibição da reação, pois se sabe que este é um potente inibidor da enzima tirosinase *in vitro*, além de ser um composto com pouca ação citotóxica, hidrossolúvel e, ainda, não se oxidar facilmente em contato com o ar.

Tabela 7 - Porcentagem de inibição da tirosinase pelo ácido kójico em diferentes concentrações utilizando solução de tirosinase a a 480 U/mL.

Concentração de ácido kójico ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentagem da inibição da tirosinase (IA%)
0,312	-
0,625	$2,48 \pm 0,034$
1,25	$2,23 \pm 0,04$
2,5	$20,60 \pm 0,04$
3,0	-
4,0	-
5,0	$25,06 \pm 0,04$
10,0	$57,82 \pm 0,04$

[129] Verifica-se que a solução de RES, bem como as nanopartículas 5, 6 e 8 apresentaram maior porcentagem de

inibição da enzima tirosinase quando comparado com a solução de ácido kójico a 5,0 µg/mL.

[130] Por sua vez, nanopartículas 5 e 6 a 10,0 µg/mL mostraram ser mais eficazes que o ácido kójico na mesma concentração.

[131] A nanopartícula 7 a 5,0 µg/mL demonstrou eficácia semelhante ao ácido kójico a 5,0 µg/mL e o mesmo ocorreu comparando 8 a 10,0 µg/mL com o ácido kójico a 10,0 µg/mL.

[132] Porém, foi observado menor ação sobre a enzima tirosinase pelas nanopartículas 7 e 8 a 10,0 µg/mL quando comparado com solução de ácido kójico nesta concentração.

[133] A solução de RES a 5,0 µg/mL inibiu 1,87 vezes mais a enzima tirosinase que a solução de ácido kójico a 5,0 µg/mL e a solução de RES a 10,0 µg/mL inibiu 1,10 vezes mais que a solução de ácido kójico a 10,0 µg/mL.

[134] As nanopartículas 5 e 6 a 5,0 µg/mL inibiram 2,61 e 2,20 vezes, respectivamente, mais a enzima tirosinase que a solução de ácido kójico na mesma concentração. A formulação 5, quando em solução a 10,0 µg/mL, inibiu a enzima tirosinase 1,55 vezes mais que o ácido kójico na mesma concentração.

[135] A nanopartícula 5, quando comparada com o RES livre, promoveu maior inibição da enzima tirosinase, sendo que inibiu 1,39 vezes mais que o RES livre quando em soluções a 5,0 µg/mL, 1,41 vezes mais quando em solução a 10,0 µg/mL, 1,61 vezes mais quando em solução a 20,0 µg/mL, 2,23 vezes mais quando em solução a 40,0 µg/mL e 1,79 vezes mais quando em solução a 80,0 µg/mL.

[136] Para a nanopartícula 6, observa-se que nem todas as concentrações das soluções preparadas foi superior a

solução de RES livre, sendo que para a solução a 5,0 µg/mL, 6 foi 1,17 vezes mais eficaz que a solução de RES livre na mesma concentração.

[137] Porém, nas concentrações de 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL, a 6 foi semelhante ao RES livre, nas mesmas concentrações, na inibição da enzima tirosinase. Já, nas concentrações 40,0 µg/mL e 80,0 µg/mL, 6 foi 1,54 e 1,47 vezes mais eficaz que a solução de RES livre, nas mesmas concentrações, na inibição da enzima tirosinase, respectivamente. Tanto a nanopartícula 7 quanto a 8 se mostraram mais eficazes na inibição da enzima tirosinase apenas quando em solução a 40,0 µg/mL e a 80,0 µg/mL.

[138] Para a formulação 7, apresentou ser 1,13 e 1,10 vezes mais eficaz na inibição da enzima que o RES livre quando em solução de 40,0 µg/mL e 80,0 µg/mL, respectivamente. E, a formulação 8 foi 1,05 e 1,07 vezes mais eficaz na inibição da enzima tirosinase que a solução de RES livre quando em solução a 40,0 µg/mL e 80,0 µg/mL, respectivamente.

[139] Verifica-se ainda que a formulação 5 a 40,0 µg/mL foi a que apresentou maior inibição da enzima tirosinase, 152,75%. Já a formulação 7 a 5,0 µg/mL foi a que apresentou menor inibição da enzima tirosinase, 27,11%.

[140] Embora a versão preferida da invenção tenha sido ilustrada e descrita, deve ser compreendido que a invenção não é limitada. Diversas modificações, mudanças, variações, substituições e equivalentes poderão ocorrer, sem desviar do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Nanopartículas lipídicas sólidas caracterizadas por compreender:

- 5,0 % material graxo selecionado dentre ácido esteárico ou estearato de polioxietileno 40;
- tensoativo selecionado dentre 3,5% copolímero tribloco ou mistura de 3,5% copolímero tribloco e 1,2% fosfatidilcolina de soja;
- conservantes microbiológicos selecionados dentre uma mistura de 0,18% metilparabeno e 0,02%propilparabeno; e
- 0,1% trans-resveratrol (RES).

2. Nanopartículas lipídicas sólidas, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo fato de que o copolímero tribloco é copolímero de polipropileno glicol flanqueado por dois blocos de polietileno glicol.

3. Nanopartículas lipídicas sólidas, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizadas pelo fato de apresentar diâmetro médio de 16,5 a 167 nm.

4. Nanopartículas lipídicas sólidas, de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizadas pelo fato de apresentar índice de polidispersividade que varia de 0,140 a 0,368, preferencialmente 0,200.

5. Nanopartículas lipídicas sólidas, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 ou 4, caracterizadas pelo fato de apresentar potencial zeta que varia de -2,58 a -2,66 mV.

6. Processo de obtenção das nanopartículas lipídicas sólidas conforme definidas nas reivindicações 1 a 5, caracterizado por compreender as etapas de:

- a. preparo da pré-emulsão;
- b. sonicação da mistura; e

c. centrifugação da mistura.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que, na etapa "a", a pré-emulsão é preparada pelo aquecimento da fase aquosa a uma temperatura que varia de 70 a 80 °C, preferencialmente 75 °C, a qual é posteriormente vertida na fase oleosa e agitada sob aquecimento durante um intervalo de tempo que varia de 1 a 2 minutos, preferencialmente 1 minuto.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que a fase aquosa compreende o copolímero tribloco.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que a fase oleosa compreende o material graxo associado ou não à fosfatidilcolina de soja e adicionado do fármaco.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que, na etapa "b", a mistura formada é sonicada durante 20 minutos, em amplitude que varia de 46 a 48%, preferencialmente 47%, e potência que varia de 490 a 510 W, preferencialmente 500 W, sendo as amostras mantidas em banho de gelo.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que, na etapa "c", promove-se a centrifugação a uma rotação que varia de 4000 a 6000 rpm, preferencialmente 5000 rpm, durante um intervalo de tempo que varia de 9 a 11 minutos, preferencialmente 10 minutos.

12. Uso das nanopartículas lipídicas sólidas conforme definidas nas reivindicações 1 a 5 **caracterizado por** ser no preparo de uma formulação farmacêutica para tratar melanoma.

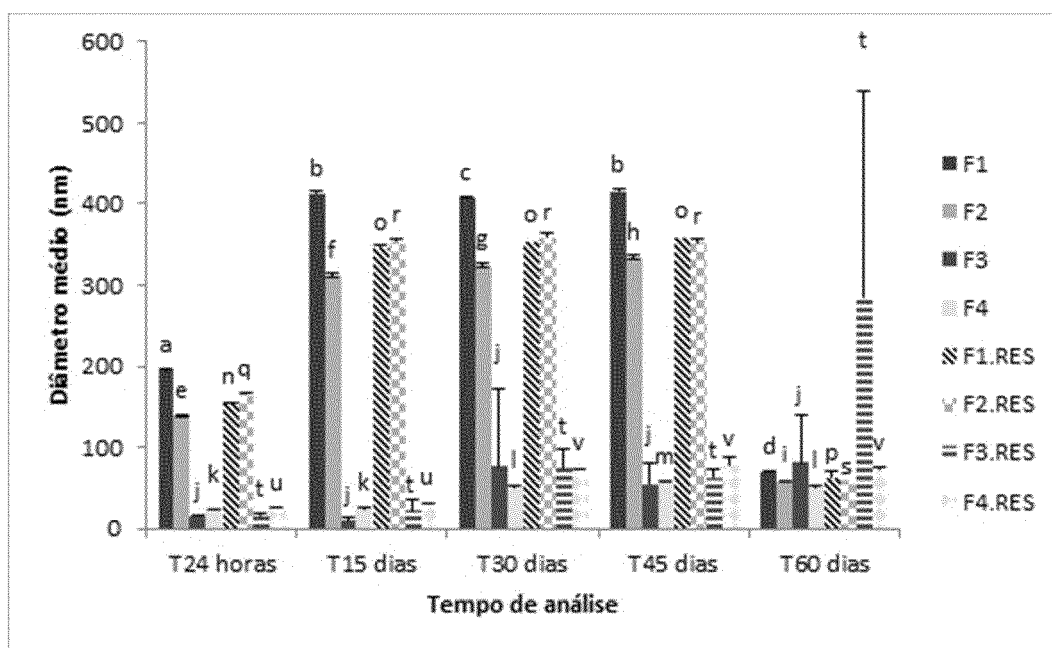
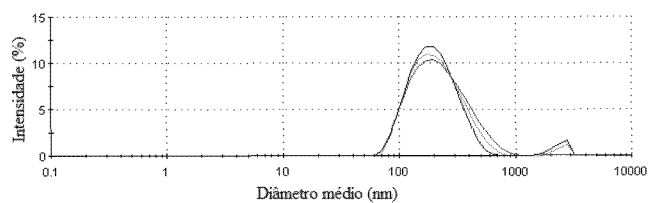
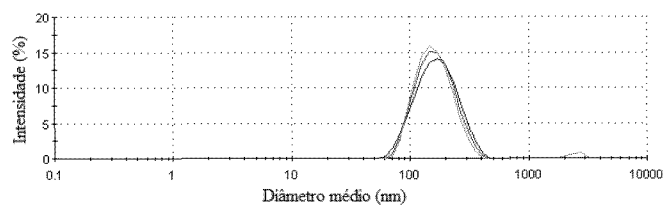
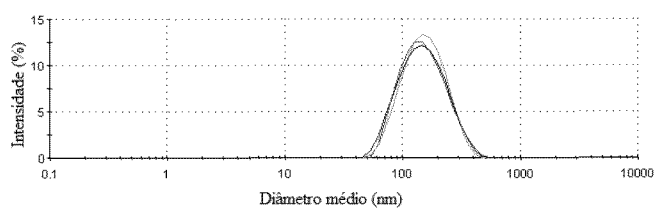
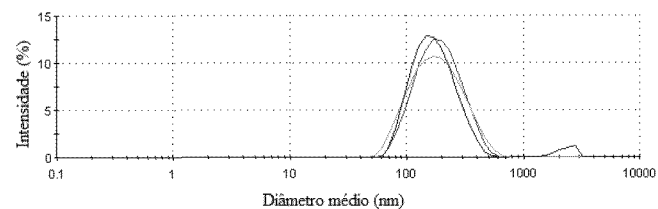
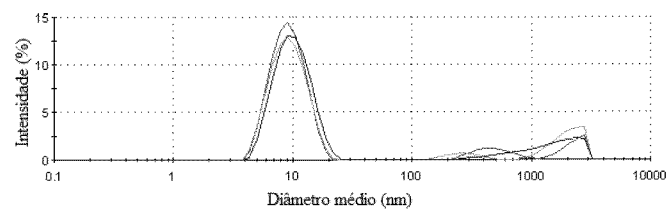
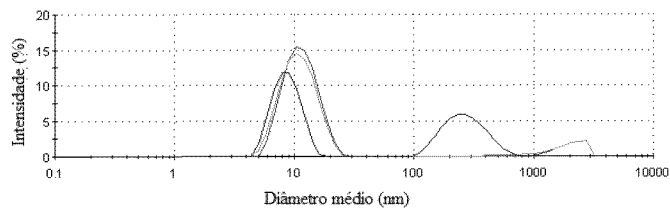
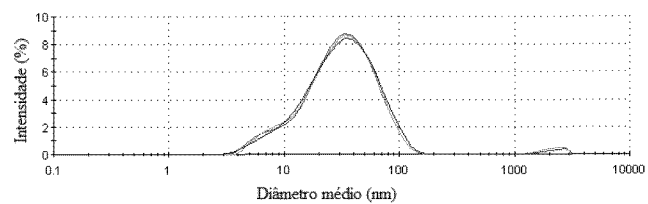
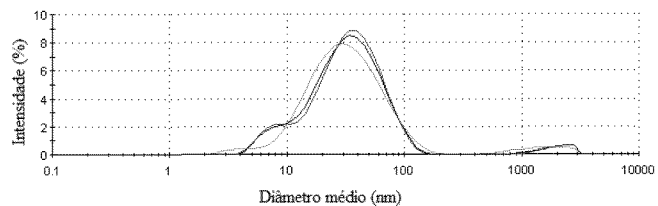


FIGURA 1

**FIGURA 2A****FIGURA 2B****FIGURA 2C****FIGURA 2D****FIGURA 2E****FIGURA 2F****FIGURA 2G****FIGURA 2H**

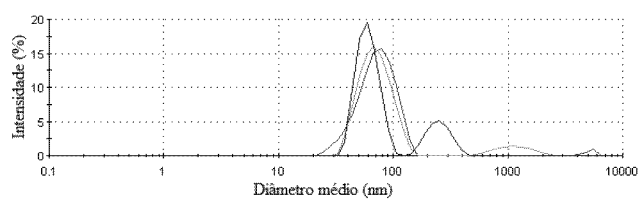
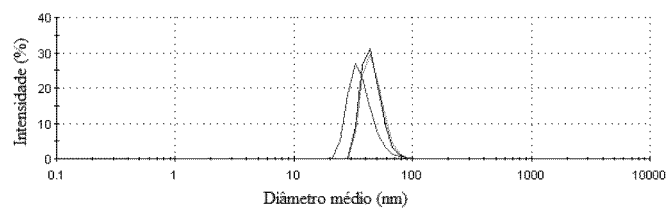
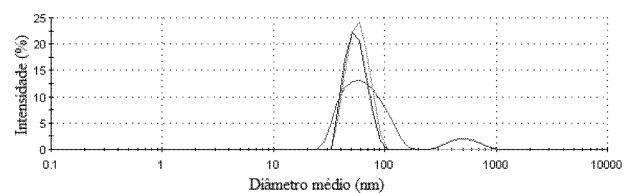
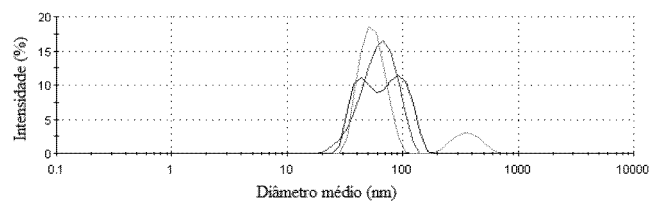
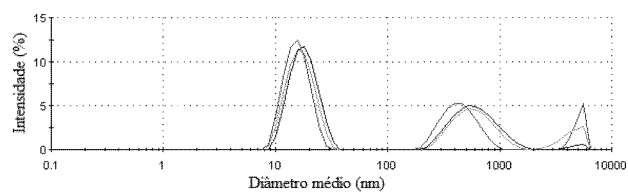
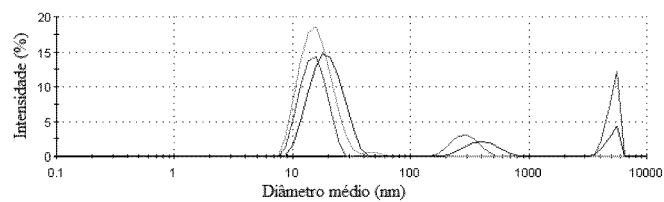
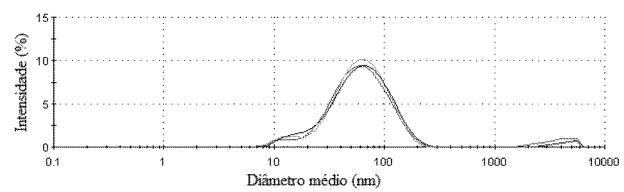
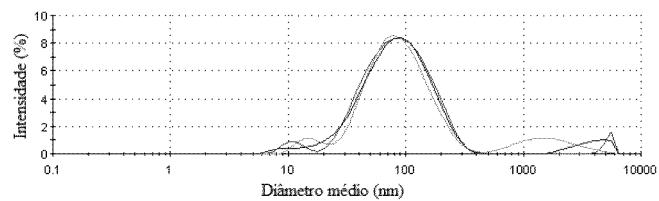
**FIGURA 3A****FIGURA 3B****FIGURA 3C****FIGURA 3D****FIGURA 3E****FIGURA 3F****FIGURA 3G****FIGURA 3H**



FIGURA 4



FIGURA 5



FIGURA 6



FIGURA 7



FIGURA 8

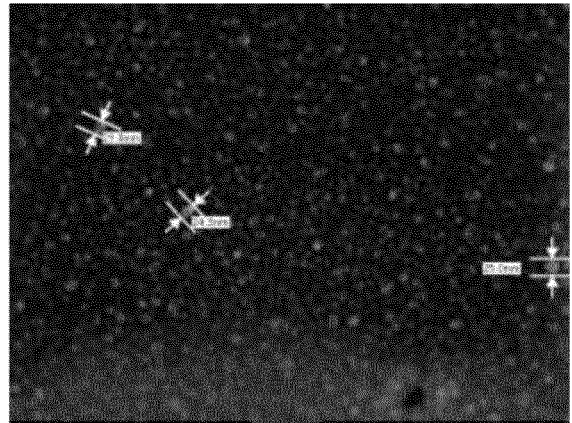


FIGURA 9



FIGURA 10

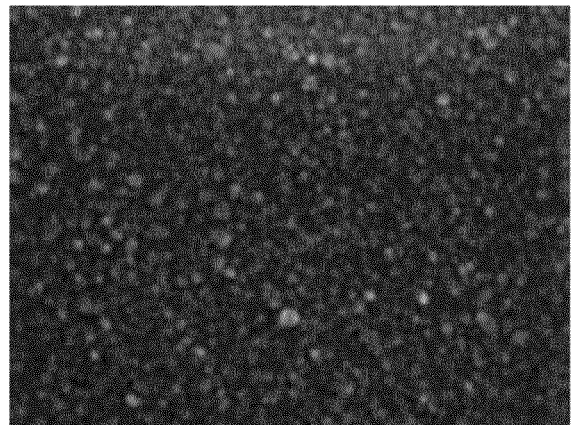
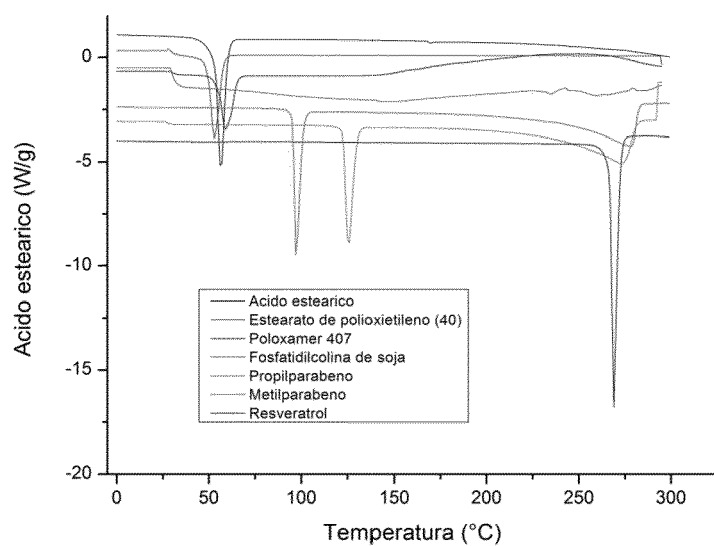
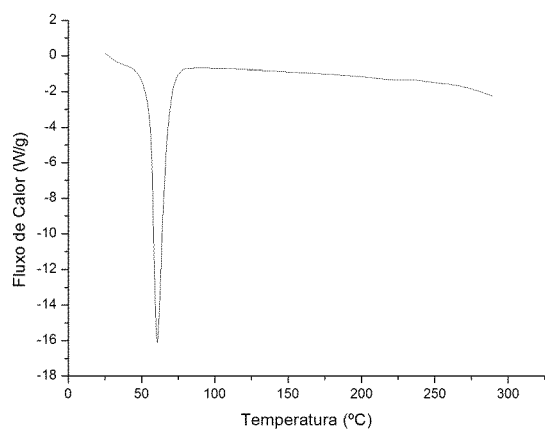
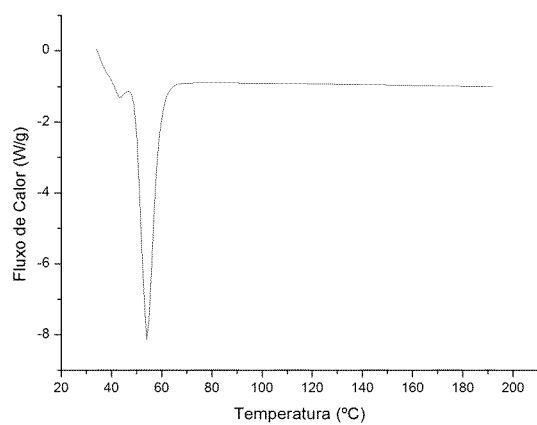


FIGURA 11

**FIGURA 12****FIGURA 13****FIGURA 14**

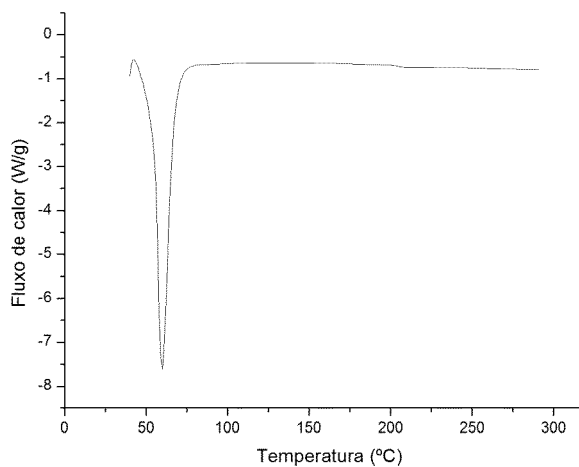


FIGURA 15

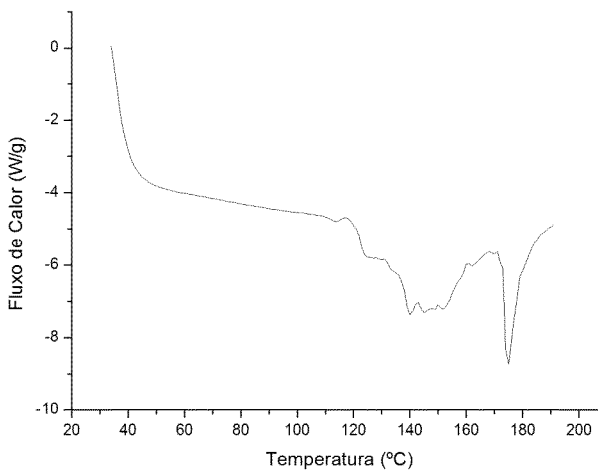


FIGURA 16

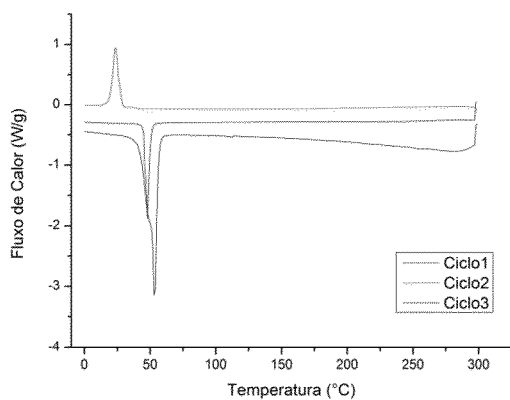


FIGURA 17

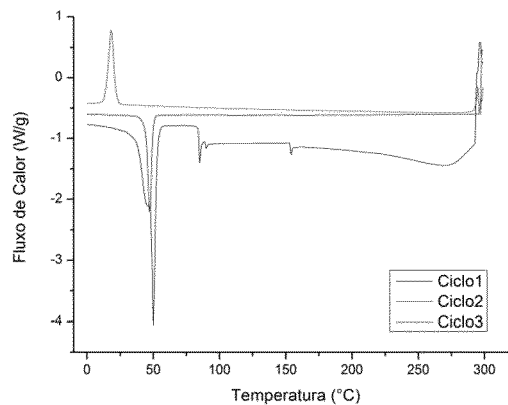


FIGURA 18

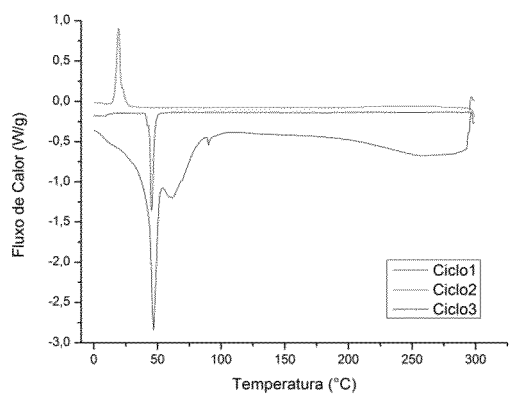


FIGURA 19

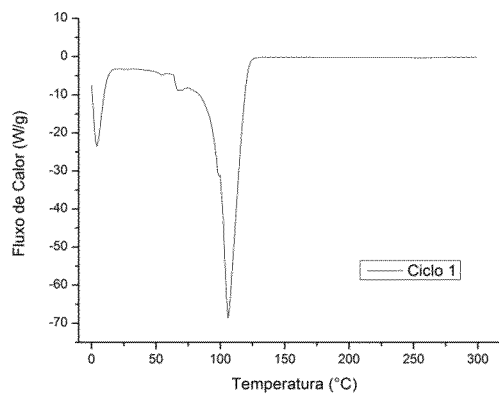
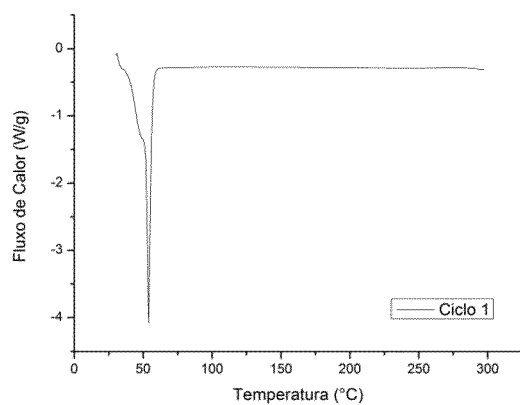
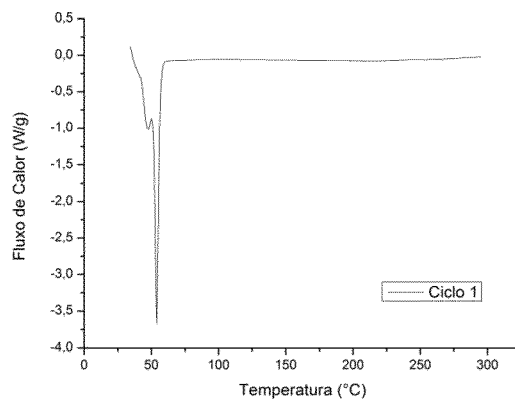
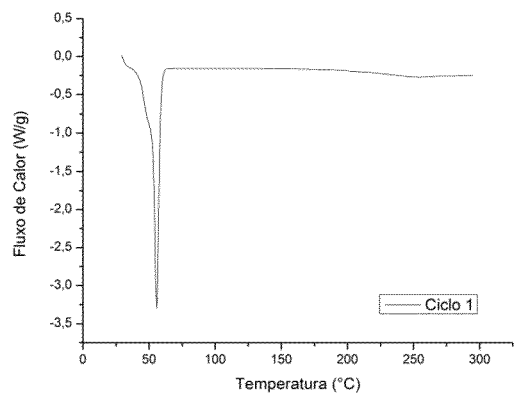
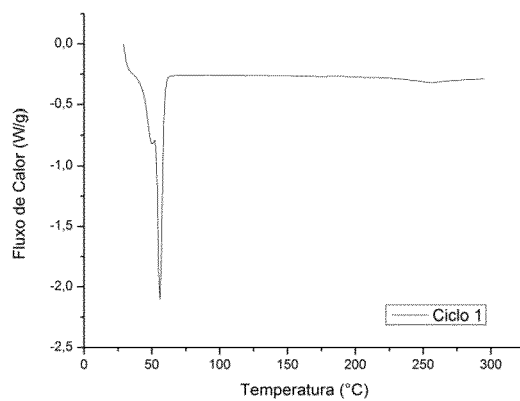
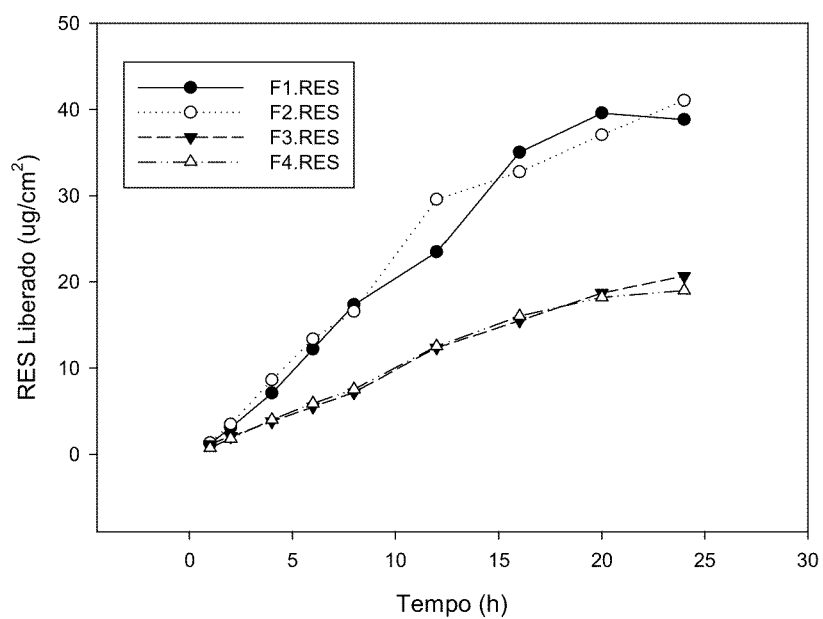
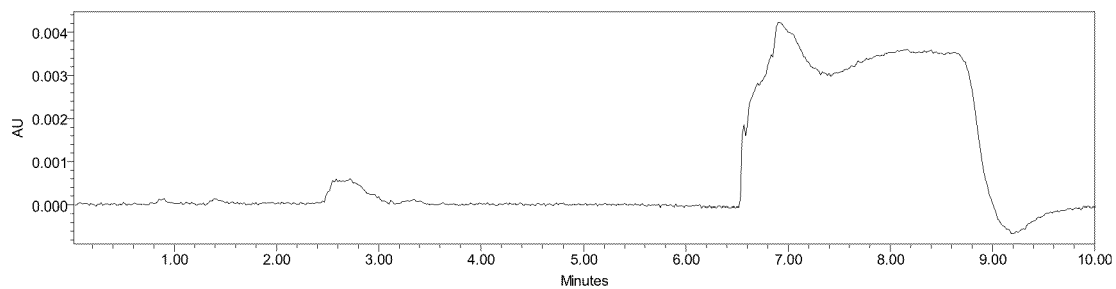
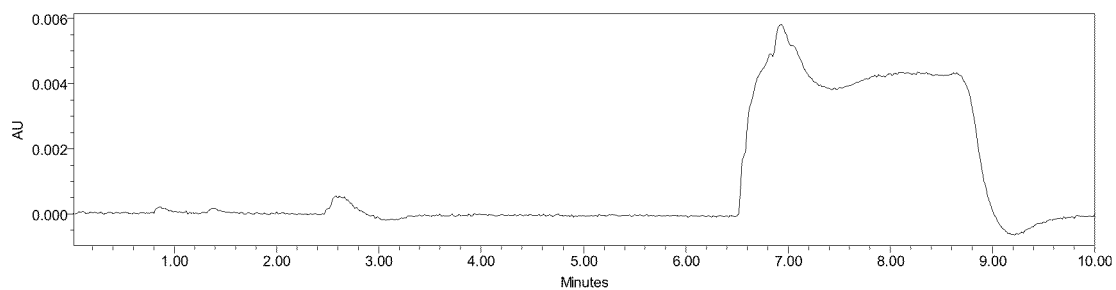


FIGURA 20

**FIGURA 21****FIGURA 22****FIGURA 23****FIGURA 24**

**FIGURA 25****FIGURA 26****FIGURA 27**

Resumo

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS,
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E SEU USO**

A presente invenção descreve um processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas com *trans*-resveratrol (RES) por sonicação, utilizando lipídio peguulado, bem como as nanopartículas obtidas e seu uso na terapia antitumoral do melanoma.