



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020010675-9 A2



(22) Data do Depósito: 27/05/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 07/12/2021

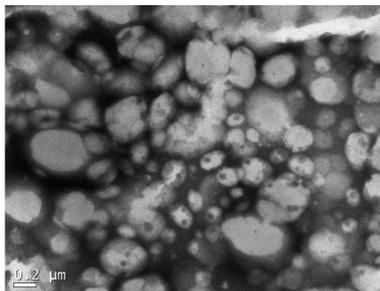
(54) **Título:** NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE CERA DE ABELHA COM ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACO HIDROFÍLICO E FÁRMACO LIPOFÍLICO VIA DUPLA EMULSÃO LIVRE DE SOLVENTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO SINÉRGICO DE MELANOMA CUTÂNEO E PROCESSO DE OBTENÇÃO

(51) **Int. Cl.:** A61K 9/51; A61K 31/325; A61K 31/121; A61K 47/44; A61K 47/26; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA; UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

(72) **Inventor(es):** ARTHUR POESTER CORDEIRO; CLAUDIA SAYER; PAULO EMILIO FEUSER; PEDRO HENRIQUE HERMES DE ARAÚJO; PAULO CESAR LOCK SILVEIRA; RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA; MARIA ELIANE MERLIN ROCHA; ELIZABETH SOUSA DA CUNHA; GLAUCIA REGINA MARTINEZ.

(57) **Resumo:** NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE CERA DE ABELHA COM ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACO HIDROFÍLICO E FÁRMACO LIPOFÍLICO VIA DUPLA EMULSÃO LIVRE DE SOLVENTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO SINÉRGICO DE MELANOMA CUTÂNEO E PROCESSO DE OBTENÇÃO. A presente invenção refere-se a uma nanopartícula lipídica sólida de cera de abelha preparada pelo processo de dupla emulsão água/óleo/água, sem utilização de solvente orgânico, contendo simultaneamente na mesma nanoestrutura um fármaco hidrofílico e um fármaco lipofílico para tratamento terapêutico sinérgico de melanoma cutâneo, associados a um processo de dupla emulsão sem a utilização de solvente orgânico visando a encapsulação simultânea de ambos os fármacos.



NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE CERA DE ABELHA COM ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACO HIDROFÍLICO E FÁRMACO LIPOFÍLICO VIA DUPLA EMULSÃO LIVRE DE SOLVENTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO SINÉRGICO DE MELANOMA CUTÂNEO E PROCESSO DE OBTENÇÃO

CAMPO TÉCNICO

[001] A presente invenção refere-se a uma nanopartícula lipídica sólida de cera de abelha preparada pelo processo de dupla emulsão água/óleo/água, sem utilização de solvente orgânico, contendo simultaneamente na mesma nanoestrutura um fármaco hidrofílico e um fármaco lipofílico para tratamento terapêutico sinérgico de melanoma cutâneo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A vetorização é uma estratégia que tem por objetivo otimizar a eficiência terapêutica de uma substância de interesse uma vez que permite modular e direcionar sua distribuição, associando-a a uma estrutura apropriada, denominada vetor (FALLEIROS; BRANDL; FONSECA, 2011).

[003] A encapsulação tanto de substâncias hidrofílicas quanto hidrofóbicas para aplicação biológica em vetores farmacológicos é uma área amplamente estudada e que visa melhorar determinadas características do material encapsulado, tais como biodisponibilidade, integridade durante o armazenamento, controle de liberação, resistência à desnaturação em meio ácido, tempo de circulação na corrente sanguínea, dispensabilidade e estabilidade química. O aprimoramento desta técnica permite ainda o aumento da eficiência quimioterapêutica de biomoléculas levando a diminuição de efeitos colaterais. Entre os tipos

de biomoléculas de interesse mais comuns podem-se citar vitaminas, proteínas, macromoléculas biológicas (DNA e RNA), óleos naturais, antioxidantes, minerais e substâncias com atividade farmacológica que podem ser tanto hidrofílicos ou lipofílicos de acordo com o perfil particular de cada molécula (HANS AND LOWMAN 2002; LOMAS ET AL. 2007; VEHRING 2008; KLAYPRADIT AND HUANG 2008; DE VOS ET AL. 2010; MUNIN AND EDWARDS-LÉVY 2011; GEALL ET AL. 2012; MCCLEMENTS 2015; ZHAO ET AL. 2017).

[004] A aplicação da nanotecnologia na biomedicina e farmacêutica tem o potencial de proporcionar benefícios significativos às práticas clínicas, oferecendo soluções para muitas das limitações atuais no diagnóstico, tratamento e manejo de doenças humanas. Nanopartículas lipídicas solidas (SLN – Solid lipid nanoparticles) são partículas feitas a partir de lipídios sólidos (isto é, lipídios que são sólidos à temperatura ambiente e também à temperatura do corpo) com um diâmetro médio entre aproximadamente 50 e 1000 nm (EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA, 2012). Por definição, as SLN são carreadores coloidais submicrométricos compostas de triacilgliceróis altamente purificados, misturas complexas de triacilgliceróis ou ceras, estabilizados por surfactante(s) ou polímero(s) e suas misturas e capazes de serem dispersos em água pura ou em uma solução aquosa de surfactante (MÜLLER et al., 2000; SARMENTO et al., 2007).

[005] O sistema de administração de fármacos composto por SLN é muito atraente, principalmente devido à baixa toxicidade e aumento da permeabilidade através das membranas celulares e da biodisponibilidade do fármaco encapsulado. A utilização de nanopartículas lipídicas na área de vetorização de fármacos tem se mostrado promissora no tratamento de câncer, uma vez que diferentes

estudos relacionados a vetorização de fármacos anticancerígenos em SLN são encontrados na literatura (VAN BUTSELE ET AL. 2007; HALEY AND FRENKEL 2008; WOLINSKY ET AL. 2012; ZHENG ET AL. 2013). Ainda, SLN apresentam características desejáveis de aumento de escala como manufatura econômica, alta eficiência de encapsulamento de drogas e viabilidade de transportar drogas lipofílicas e hidrofílicas (DATE et al., 2018; MALAM; LOIZIDOU; SEIFALIAN, 2009; MALE; GROMNICOVA; MCQUAID, 2016).

[006] Diferentes tipos de matrizes lipídicas são relatados na literatura (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; ALMEIDA; SOUTO, 2007; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009; MEHNERT; MÄDER, 2012). A cera de abelha é um composto orgânico não parafínico composto principalmente de uma combinação de ésteres de ácidos graxos, álcoois de cadeia longa, hidrocarbonetos parafínicos e ácidos graxos livres (AMIN et al., 2017). A cera de abelha tem grande aplicação nas áreas alimentícia e farmacêutica, sendo um material potencial para a formulação de nanopartículas devido a sua estabilidade em vários níveis de pH e umidade, hidrofobicidade (MILANOVIC et al., 2017) e propriedades antibacterianas (FRATINI et al., 2016).

[007] O processo de produção de nanopartículas lipídicas via dupla emulsão pode ser estruturado de duas formas: água/óleo/água onde, uma emulsão água/óleo com surfactante lipofílico é preparada e adicionada a uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico que permite “emulsionar a emulsão” inicial formando o sistema água/óleo/água; e óleo/água/óleo, que de forma alternada parte de uma emulsão óleo/água estabilizada por surfactante hidrofílico que por sua vez é emulsionada em uma fase oleosa contendo surfactante lipofílico,

dando origem à formulação óleo/água/óleo. Esse tipo de sistema já demonstrou grande potencial em áreas como medicina, farmacêutica, cosméticos e indústria de alimentos principalmente para encapsulação e liberação controlada de substâncias, produção de alimentos com menor teor de gordura e recobrimento de superfícies dos mesmos a fim de manter integridade, aroma e sabor. A utilização deste método permite a formação de partículas do tipo casca/núcleo que por sua vez viabiliza a encapsulação de diferentes tipos de biomoléculas hidrofílicas e/ou hidrofóbicas; a utilização de lipídios na parte externa da capsula assegura a biocompatibilidade do material além de possibilitar a modificação da superfície de acordo com a necessidade de aplicação (MUSCHIOLIK 2007; LAMBA ET AL. 2015; SILVA ET AL. 2016; CAMPANI ET AL. 2018).

[008] O melanoma é um tipo de câncer de pele que se origina nos melanócitos, responsáveis pela pigmentação da pele, e se caracteriza por ser altamente agressivo e metastático (SALEH 2018). De acordo com o levantamento de dados realizado pela agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (International Agency for Research on Cancer) a estimativa é de que anualmente aproximadamente 287 mil novos casos e mais de 60 mil óbitos são oriundos desta forma de câncer de pele, atingindo principalmente a população ente 20 e 35 anos de idade (LIU ET AL. 2018; BRAY ET AL. 2018; SCHADENDORF ET AL. 2018). Se diagnosticado nos estágios iniciais a doença pode ser curada em 80% dos casos através de ressecção cirúrgica dos tumores; no entanto, em função de sua forte natureza metastática o câncer pode se propagar e atingir outras regiões do corpo (e.g. fígado, cérebro, pulmões e ossos), e nesses casos, o taxa de sobrevivência é de apenas 6 meses com aumento de 81% na taxa de

mortalidade após 5 anos (GRAY-SCHOPFER ET AL. 2007; FLAHERTY AND FISHER 2011; WOODMAN ET AL. 2012; SALEH 2018). Além disso, após atingir a forma metastática, o câncer se torna ainda mais resistente principalmente em função da ineficiência das terapias e prognósticos atualmente existentes (GRAY-SCHOPFER ET AL. 2007; LIU ET AL. 2018).

[009] O crescente aumento da complexidade no tratamento de doenças utilizando agentes terapêuticos já estabelecidos tem despertado o interesse pelo desenvolvimento de fármacos que utilizam o efeito sinérgico de dois ou mais fármacos principalmente no caso de doenças como câncer e HIV; este tipo de estratégia visa contornar a resistência criada pela doença a fármacos já utilizados além de diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficiência terapêutica dos mesmos (BAYAT MOKHTARI et al., 2017; TAN et al., 2012). A encapsulação de apenas uma molécula farmacológica de caráter hidrofílico ou lipofílico para o tratamento de melanoma é amplamente descrita na literatura, sendo possível citar (ATHAWALE et al., 2014; YONCHEVA et al., 2019) e os documentos BR1020140173161A2, WO2004080396, AU2018201814, KR101621607B1 e WO2014052634A1. Os estudos citados anteriormente possuem como característica comum a encapsulação de apenas um agente terapêutico na composição do vetor utilizado e desta forma não há geração de efeito sinérgico entre os componentes do sistema esse fato leva a uma necessidade de maiores doses do agente utilizado para que exista um efeito anticancerígeno sobre o melanoma.

[0010] De maneira mais avançada, diferentes tecnologias envolvendo a utilização e/ou encapsulação simultânea de dois ou mais fármacos em nanocarreadores para o tratamento de melanoma já foram relatadas na literatura. De forma mais relevante para este trabalho em

questão é possível citar: LABALA et al., (2017) que realizaram a co-encapsulação de dois agentes terapêuticos distintos em nanopartículas metálicas de ouro, todavia esse tipo de carreador farmacológico não possui características desejáveis para aplicação biológica como biodegradabilidade e reabsorção pelo organismo humano; o documento JP2017160214A1 que utiliza dois agentes terapêuticos diferentes, afim de obter um efeito anticancerígeno sinérgico sob células de melanoma, mas, no entanto na falta de um vetor comum para as moléculas dificulta sua internalização e ação conjunta sobre a célula alvo além de dificultar o decréscimo das doses administradas de cada um dos agentes para obtenção do sinergismo; e o documento AU2018201814A1 que faz uso de um agente terapêutico lipofílico encapsulado e administração de outra terapia de forma subsequente para obter efeito terapêutico sinérgico entre as duas; a não encapsulação de ambos os agente terapêuticos não garante sua internalização e ação conjunta sob a célula alvo bem como dificulta a diminuição das doses administradas de cada um dos agentes para obtenção do sinergismo.

[0011]Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[0012]A presente invenção tem por objetivo eliminar as desvantagens apontadas nos artigos e documentos de patentes encontrados na literatura relacionados ao tratamento terapêutico sinérgico de melanoma e/ou utilização de nanopartículas como vetores no tratamento deste câncer.

[0013] Desta forma, é importante destacar que a encapsulação simultânea de fármacos em nanopartículas lipídicas sólidas produzidas via dupla emulsão (água/óleo/água) apresenta vantagens como a capacidade de incorporar tanto moléculas hidrofílicas quanto lipofílicas na mesma nanoestrutura; não necessitar de solventes orgânicos para sua preparação; apresentar elevada eficiência de encapsulação para ambos os fármacos utilizados; internalização simultânea de moléculas hidrofílicas lipofílicas na célula alvo e aumento do controle sob a liberação e direcionamento das moléculas terapêuticas. Ainda, a utilização de um vetor farmacológico natural, neste caso a cera de abelha branca, e um processo sem a utilização de solvente orgânicos possibilitam ao produto, neste caso as nanopartículas lipídicas sólidas, características de interesse para aplicação biomédica e farmacêutica como biocompatibilidade, biodegradabilidade e reabsorção pelo organismo.

[0014] Adicionalmente, a presente invenção permite a obtenção de efeito terapêutico sinérgico entre as moléculas encapsuladas na nanopartícula lipídica sólida. A obtenção de sinergismo entre as moléculas encapsuladas sobre células de melanoma apresenta como vantagem a diminuição na dosagem administrada de ambas as moléculas diminuindo assim os riscos de existirem efeitos colaterais citotóxicos ligados à exposição aos agentes terapêuticos utilizados.

[0015] É importante dizer que não há nenhum produto com as características descritas na presente invenção, que são nanopartículas lipídicas sólidas de ceras de abelha contendo simultaneamente em sua estrutura um fármaco hidrofílico e um fármaco lipofílico para terapia tópica de melanoma cutâneo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0016]A caracterização da presente invenção é feita por meio de figuras representativas das nanopartículas lipídicas sólidas de cera de abelha com encapsulação simultânea de fármaco hidrofílico e fármaco lipofílico via dupla emulsão livre de solvente e composição farmacêutica para o tratamento sinérgico de melanoma cutâneo, de tal modo que o produto possa ser integralmente reproduzido por técnica adequada, permitindo plena caracterização da funcionalidade do objeto pleiteado.

[0017]A partir das figuras apresentadas que expressam a melhor forma ou forma preferencial de se obter o produto ora idealizado, se fundamenta a parte descritiva do relatório, através de uma numeração detalhada e consecutiva, onde a mesma esclarece aspectos que possam ficar subentendidos pela representação adotada, de modo a determinar claramente a proteção ora pretendida.

[0018]Estas figuras são meramente ilustrativas, podendo apresentar variações de acordo com a técnica de caracterização utilizada, desde que não fujam do inicialmente pleiteado.

[0019]Neste caso se tem que:

- A FIGURA 1 mostra a microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas por dupla emulsão água/óleo/água;
- A FIGURA 2 mostra a microscopia de fluorescência das nanopartículas lipídicas sólidas: (a) marcador fluorescente 6-Cumarin e filtro verde e (b) marcador fluorescente doxorubicina e filtro;
- A FIGURA 3 mostra os espectros de FTIR; e
- A FIGURA 4 mostra o efeito citotóxico de DETC+4NC na forma livre e encapsulados em SLN em células de melanoma B16F10.

[0020]A presente invenção diz respeito a uma nanopartícula que compreende pelo menos um fármaco hidrofílico, pelo menos um fármaco lipofílico e pelo menos um veículo farmacologicamente aceitável, associados a um processo de dupla emulsão sem a utilização de solvente orgânico visando a encapsulação simultânea de ambos os fármacos.

[0021]O veículo farmacologicamente aceitável da presente invenção pode ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores farmacologicamente aceitáveis, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de vias de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular.

[0022]Entende-se como fármaco qualquer substância química conhecida e de estrutura química definida dotada de propriedade farmacológica e/ou terapêutica. Em termos correntes, a palavra fármaco designa todas as substâncias que possuem de fato atividade farmacológica no tratamento de doenças, ou pelo menos características de interesse ligadas as áreas da farmacologia e medicina. Substâncias farmacológicas podem ser classificadas de acordo com sua hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade através do coeficiente de partição octanol/água (P) que indica a tendência preferencial do material de se solubilizar na fase aquosa ou oleosa de determinado sistema. Fármacos hidrofílicos são caracterizados por possuírem coeficiente partição $P < 1$, serem facilmente solúveis em meio aquoso, e conseqüentemente, poderem ser dissolvidos facilmente em fluídos corporais. No entanto fármacos com esse perfil tendem a apresentar baixa biodisponibilidade, em virtude da sua baixa permeabilidade através das membranas

celulares que são naturalmente lipoprotéicas. De forma oposta, fármacos lipofílicos são substâncias que possuem coeficiente $P > 1$, tem maior afinidade pela fase oleosa do sistema, e desta forma, são capazes de penetrar facilmente as membranas celulares. Todavia o aumento da lipossolubilidade da molécula pode limitar sua absorção em função da dificuldade de solubilização em meios biológicos.

[0023]Os exemplos aqui descritos devem ser encarados como algumas das inúmeras formas de realizar a invenção, não devendo, portanto, serem encarados de forma restritiva, mas sim ilustrativa.

MATERIAIS E MÉTODOS

[0024]A não ser nos casos explicitamente descritos de forma distinta, nos próximos parágrafos a formulação básica utiliza os materiais descritos a seguir: água destilada (H_2O), cera de abelha branca ($C_{15}H_{31}COOC_{30}H_{61}$) (GM Ceras Ltda.), dietilditiocarbamato de sódio ($C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$) (VETEC Química), lecitina de soja ($C_{35}H_{66}NO_7P$) (Alfa Aesar), Crodamol GTCC que se dá por uma mistura de triglicerídeos de cadeia média constituídos principalmente de ésteres dos ácidos cápricos ($C_{10}H_{20}O_2$) e caprílicos ($C_8H_{16}O_2$) (Alfa Química Ltda.), 4-nitrochalcona ($C_{15}H_{11}NO_3$) e polissorbato 80 ($C_{32}H_{60}O_{10}$) (VETEC Química).

ETAPA 1

[0025]Na primeira etapa em um frasco de 15 ml, adiciona-se 0,45 g de cera de abelha branca e 0,045 g de lecitina de soja. O recipiente é colocado em um banho de água sobre uma chapa de aquecimento com agitação (Agitador Magnético com Aquecimento IKA modelo HS 7) a 70 °C, um agitador magnético é adicionado ao frasco e sua intensidade é regulada para 50 rpm, após a fusão e homogeneização da cera de abelha com a lecitina adiciona-se 0,42ml de uma solução de

4-nitrochalcona em Crodamol GTCC (10 mg/ml) a mistura formando a matriz lipídica da nanopartícula e que posteriormente será sua camada externa.

ETAPA 2

[0026]A segunda etapa do processo é a adição de 0,40 ml da fase aquosa, composta por uma solução contendo dietilditiocarbamato de sódio em água (20 mg/ml), ao frasco contendo a mistura descrita na ETAPA 1. A mistura permanece sob aquecimento apenas o tempo necessário para homogeneização (30 s) e então a mesma é submetida a dispersão ultrassônica com sonda (Homogeneizador ultrassônico Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500) por 15s com amplitude de 45%.

ETAPA 3

[0027]Imediatamente após a ETAPA 2 uma solução contendo polissorbato 80 em água (90 mg/ml), é recomendado que o frasco da solução de polissorbato 80 fique reservado no banho de água sob de aquecimento a 70 °C até sua utilização, é adicionada ao frasco contendo a mistura das ETAPAS 1 e 2 e esta é então mantida no banho de água sob de aquecimento a 70 °C por 10 min sob agitação magnética de 400 rpm. Decorrido o período de 10 min o material é novamente submetido à dispersão ultrassônica com sonda por 1 min (pulsos de 15 s on e 10 s off) com amplitude de 70%. Imediatamente após o término da dispersão ultrassônica o material contido no frasco é transferido para um béquer de 100 ml contendo 35 ml de água a 7 °C sob agitação magnética (Agitador Magnético sem aquecimento IKA modelo Color Squid) de 400 rpm e permanece por 5 min para que haja a completa solidificação das nanopartículas lipídicas.

LIOFILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

[0028] Em função das características hidrofílicas do dietilditiocarbamato de sódio a liofilização das nanopartículas se faz necessária para evitar a difusão do fármaco para o meio aquoso externo. A preparação do material para liofilização se dá pela centrifugação de 2 ml da formulação final (EPPENDORF, MiniSpin, Alemanha) a 13300 rpm por 30 min para retirada do sobrenadante; o líquido retirado foi novamente centrifugado sob as mesmas condições. As nanopartículas obtidas nos processos foram colocadas em um único recipiente e redispersas com uma solução de 10% D-(+)-Trealose dihidratada (Sigma Aldrich) em água destilada. O material foi armazenado em ultra freezer por 48 horas a temperatura de -80°C e liofilizado (L101, Liotop, Brasil) por 48 horas. Depois de seco o material permaneceu em desumidificador sob proteção da luz até ser utilizado.

ANÁLISE MORFOLÓGICA E SUPERFICIAL

[0029] O diâmetro de partícula e o índice de polidispersão foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS do inglês dynamic light scattering) (Nanosizer, Malvern Instruments, U.K.). A carga superficial das nanopartículas em suspensão foi verificada pela medida do potencial zeta (Zetasizer, Malvern Instruments, U.K.). As análises foram realizadas logo após a preparação das nanomaterial e verificação do pH através da diluição de 3 gotas de formulação em 2 ml de água destilada. Depois do processo de liofilização os mesmos parâmetros foram verificados após redispersar as nanopartículas em água destilada, realizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. As análises foram feitas em triplicata e os dados são apresentados como a média seguido pelo desvio padrão.

[0030] Com o intuito de verificar a morfologia, as nanopartículas lipídicas sólidas foram submetidas a microscopia eletrônica de

transmissão (TEM do inglês transmission electron microscopy) (TEM100 kV – JEM-1011) utilizando o equipamento que se encontra alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Para esta análise uma alíquota da dispersão foi diluída de acordo com seu teor de sólidos até alcançar 0,5% e uma solução 5% de acetato de uranila foi adicionada na razão 20:1. Após 15 min uma gota da amostra preparada foi pingada sob a grade de cobre recoberta por um filme de carbono que permaneceu secando a temperatura ambiente por 48 horas até análise.

EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

[0031] Para fazer a medida de eficiência de encapsulação (EE%) dos fármacos pelo processo de dupla emulsão foi utilizado um método de filtração no qual as nanopartículas são separadas do meio aquoso e é possível determinar a concentração de fármaco que não foi internalizada no nanomaterial. Tal procedimento foi realizado centrifugando 0,5 ml da formulação final em filtros centrífugos Amicon® Ultra (Millipore, 100 kDa) por 30 min. Após, o sobrenadante foi recolhido e diluído 11x para análise em espectrofotômetro UV/Vis (U-1900, Hitachi). As concentrações de 4-nitrochalcona (4NC) e dietilditiocarbamato de sódio (DETC) foram determinadas nos comprimentos de onda de 324 e 281 nm, respectivamente. Curvas de calibração foram previamente estabelecidas utilizando diferentes concentrações de DETC (0,5-18 µg/ml) e 4NC (0,1-9 µg/ml) permitindo relacionar as absorbâncias obtidas em 324 e 281 com a concentração de 4NC e DETC, respectivamente.

[0032] A EE% foi calculada utilizando a equação $EE\% = ((C_1 - C_s) / C_1) \times 100$, na qual C_1 é concentração inicial de fármaco na formulação e C_s é a concentração de fármaco no sobrenadante. As análises foram

feitas em triplicata e os dados são apresentados como a média seguida pelo desvio padrão.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

[0033]A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o equipamento Microscópio Óptico Olympus BX41 com câmera CCD foi utilizada para verificar a encapsulação simultânea de compostos hidrofílicos e lipofílicos nas SNLs. Para realização deste ensaio os compostos DETC e 4NC foram substituídos pelos marcadores fluorescentes Doxorrubicina e 6-Cumarin respectivamente. Para o preparo das amostras 500 µl da suspensão de nanopartículas foram centrifugados com filtro centrífugo Amicon® Ultra (Millipore, 100 kDa) a 13300 rpm por 30 min. Após a separação, as SLN foram ressuspensas em água destilada e pingadas em lâminas de vidro. As SLN foram observadas com lentes objetivas de 100 × usando filtros vermelho (U-MGW2) e verde (U-MWB2) para identificar a Doxorrubicina e o 6-Cumarin, respectivamente.

ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

[0034]A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR do inglês Fourier transform infrared spectroscopy) (FTIR, IRPrestige-21, Shimadzu) foi utilizada para corroborar os dados referentes a encapsulação dos fármacos nas nanopartículas lipídicas sólidas. As análises foram realizadas a partir das nanopartículas liofilizadas bem como dos fármacos puros e da cera de abelha, em pastilhas de KBr na faixa 4400 –350 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. A amostra da mistura física dos fármacos e cera de abelha foi preparada utilizando a mesma proporção entre os compostos presentes nas SLN.

ESTUDOS IN VITRO

[0035] Para os ensaios de viabilidade celular a linhagem celular B16, representativa de melanoma de camundongo, adquirida do banco de células americano denominado ATCC (American Type Culture Collection). As células foram cultivadas em meio Dulbeco's Modified Eagle Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecos - DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina (100 U/ml). Adicionalmente, as culturas foram mantidas em uma estufa para cultura celular com temperatura regulada a 37 °C, umidade do ar a 95% e 5% de CO₂. Para os ensaios de citotoxicidade, 1x10⁴ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h (37 °C – 5% CO₂). Após, as células foram tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas contendo DETC+4NC (0,9/0,5; 2,3/1,2 e 5,3/3 µg/mL). As concentrações dos fármacos combinados também tiveram sua citotoxicidade avaliada sob a forma livre. Em seguida, as células foram incubadas novamente por 24h. Células não tratadas foram utilizadas como grupo controle. Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS e a viabilidade células foi avaliada pelo método do MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium). 100 µL da solução de MTT (0,5mg·ml⁻¹) foram adicionados em cada poço e as células incubadas por 3h. Na sequência, os cristais de Formazam, produto da reação de óxido-redução mitocondrial das células viáveis, foram dissolvidos em 100 µL de álcool isopropílico, e a intensidade de coloração foi determinada por espectrometria, 540nm (Loccus LM-96 microplate).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

[0036] O efeito sinérgico sobre células B16-F10 obtido a partir das diferentes concentrações de 4NC e DETC nas nanopartículas e na

forma livre foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando pós teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

ANÁLISE MORFOLÓGICA E SUPERFICIAL

[0037]A Tabela 1 apresenta os dados de tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas contendo DETC e 4NC antes e após o processo de secagem por liofilização. O método de dupla emulsão água/óleo/água sem o uso de solvente se mostrou eficiente na produção de nanopartículas lipídicas sólidas. O nanomaterial apresentou um tamanho médio desejável visando sua internalização celular (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017), o aumento no diâmetro média observado após a liofilização não compromete a aplicação farmacológica do nanomaterial uma vez que partículas <500 nm são capazes de permear os vasos sanguíneos que suprem células tumorais (LINCE et al., 2011).

[0038]O índice de polidispersão se mostrou aceitável antes e após o processamento do material. A permanência do potencial zeta acima do valor absoluto de 30 mV indica uma elevada carga superficial no nanomaterial de forma que as forças de repulsão entre as nanopartículas evitam sua agregação, as nanopartículas lipídicas sólidas se mostram estáveis antes e após a liofilização (Honary and Zahir 2013). A manutenção das características superficiais e morfológicas das nanopartículas lipídicas sólidas após a liofilização é de vital importância para garantir a viabilidade do nanomaterial por um período de tempo mais longo, garantindo que a concentrações de fármaco em seu interior sejam preservadas até o momento da sua aplicação.

[0039]A Figura 1 permite observar as nanopartículas

produzidas por dupla emulsão água/óleo/água. A utilização do acetato de uranila destacou o contraste entre as fases orgânica e aquosa, evidenciando a morfologia semiesférica das nanopartículas. O tamanho observado na microscopia eletrônica de transmissão concorda com os dados obtidos no DLS.

EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

[0040]A utilização da técnica de dupla emulsão água/óleo/água se mostrou extremamente eficiente na encapsulação simultânea de fármacos. A solubilização de cada um dos fármacos separadamente no meio de maior afinidade permitiu atingir uma alta eficiência de encapsulação dos ativos durante o processo de produção das nanopartículas lipídicas sólidas. Para o fármaco hidrofílico, dietilditiocarbamato de sódio, foi possível alcançar uma EE% de $86,3 \pm 2,8\%$; a encapsulação do ativo lipofílico, 4-nitrocahlcona, se mostrou igualmente elevada chegando a EE% de $98,7 \pm 1\%$.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

[0041]A Figura 2a apresenta as nanopartículas lipídicas sólidas sob lentes objetivas de 100x e filtro verde (U-MWB2) enquanto a Figura 2b mostra as SLN sob lentes objetivas de 100x e filtro vermelho (U-MGW2). Como pode ser observado, as figuras apresentam estruturas esféricas correspondentes em dimensão e posição; desta forma é possível dizer que ambos os marcadores fluorescentes se fazem presentes nas estruturas. O método de dupla emulsão água/óleo/água se mostra capaz de encapsular simultaneamente compostos hidrofílicos e lipofílicos. As estruturas observadas apresentaram diâmetro de aproximadamente 10 μm , o acréscimo na dimensão das nanopartículas, em relação aos dados da Tabela 1, pode ser explicado pela formação de aglomerados após o processo de centrifugação utilizando filtros. Todavia,

a agregação das nanopartículas se mostrou benéfica para identificação dos marcadores fluorescentes nas fases aquosa e oleosa uma vez que o aumento de 100x do microscópio ótico permite observar no máximo partículas com diâmetro de 1µm.

ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

[0042]A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada a fim de verificar a possibilidade de interações químicas entre os fármacos e a matriz lipídica do nanomaterial, além de corroborar os dados referentes e eficiência de encapsulação. Como pode ser visualizado na Figura 3 a 4NC pura apresenta picos característicos em 2918, 2848 cm^{-1} (estiramento C-H), 3075 cm^{-1} (estiramento C-H assimétricos), 1659 cm^{-1} (estiramento C=O), 1607, 1594, 157 cm^{-1} (estiramento C=C), 1512 cm^{-1} (estiramento N-O₂), 1409, 144 cm^{-1} (deformação C-H), 1337 cm^{-1} (estiramento C=C-NO₂), 1221,1106 (C-C estrutural), 1013 cm^{-1} e inferiores (deformação C-H aromáticos) (CHEMISTRY, 2014; MERCK/SIGMA-ALDRICH, [s.d.]; PATIL et al., 2006; SILVERSTEIN et al., 2005). No DETC puro por sua vez foram observados picos em 1423 cm^{-1} (N-CS₂) 1070, 2104 cm^{-1} (C=S) e 837, 909, 985 cm^{-1} (C-S) (GAO et al., 2017; LI et al., 2012; YAN et al., 2016). A cera de abelha possui picos em 2922, 2848 cm^{-1} (estiramento C-H), 1736 cm^{-1} (estiramento dos grupamentos carbonila de ésteres), 1467 cm^{-1} (C-H) e 1300 a 728 cm^{-1} relacionados aos grupos ésteres (LUO et al., 2012; MAKLED; NAFEE; BORAIE, 2017). Ao realizar a encapsulação das biomoléculas na cera de abelha apenas os picos da matriz lipídica são observados, indicando que não houve interação química entre os fármacos e/ou alteração na estrutura química do nanomaterial, mantendo as características de biocompatibilidade e

biodegradabilidade da matriz lipídica (OMWOYO et al., 2014; REIS ANTUNES JUNIOR et al., 2017; ROMPICHARLA et al., 2017; YASIR; SARA, 2014).

ESTUDOS IN VITRO

[0043]O efeito das SLN contendo DETC+4NC teve seu efeito citotóxico sob a viabilidade de células de melanoma B16F10 avaliado nas concentrações 0,9/0,5; 2,3/1,2 e 5,3/3 µg/ml (DETC+4NC) e comparado com as mesmas concentrações dos fármacos livres e células não tratadas (grupo controle).

[0044]A combinação entre DETC e 4NC foi capaz de diminuir a viabilidade celular em todas as concentrações testadas. A co-encapsulação da droga foi capaz de melhorar o efeito terapêutico sinérgico sobre as células de melanoma observado aplicando-as de forma livre. Os tratamentos com SLN contendo 2,3^{DETC} / 1,2^{4NC} e 5,3^{DETC} / 3^{4NC} foram capazes de diminuir significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo controle. Além disso, o ensaio com SLN contendo 5,3^{DETC}/ 3^{4NC} apresentou o maior decréscimo na viabilidade celular (64%). Os fármacos livres não foram capazes de superar os resultados obtidos utilizando as SLN como vetor.

REFERÊNCIAS:

- ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 6, p. 478–490, 10 jul. 2007.
- AMIN, M. et al. Thermal properties of beeswax/graphene phase change material as energy storage for building applications. *Applied Thermal Engineering*, v. 112, p. 273–280, 5 fev. 2017.
- ATHAWALE, R. B. et al. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. *Biomedicine &*

- Pharmacotherapy, v. 68, n. 2, p. 231–240, 1 mar. 2014.
- BAYAT MOKHTARI, R. et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, v. 8, n. 23, p. 38022–38043, 6 jun. 2017.
 - BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018:
 - GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 12 set. 2018.
 - CAMPANI, V.; GIARRA, S.; DE ROSA, G. Lipid-based core-shell nanoparticles: Evolution and potentialities in drug delivery. *OpenNano*, v. 3, p. 5–17, 1 jan. 2018.
 - CHEMISTRY, R. S. Infrared Spectroscopy. *Modern Chemical Techniques*, p. 62–91, 2014.
 - DATE, T. et al. Lipid-polymer hybrid nanocarriers for delivering cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release*, v. 271, p. 60–73, 10 fev. 2018.
 - DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, v. 20, n. 4, p. 292–302, 1 abr. 2010.
 - EKAMBARAM, P.; SATHALI, A. H.; PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: a Review. *Scientific Reviews & Chemical Communications*, 2012.
 - FALLEIROS, J. P. B.; BRANDL, A. L.; FONSECA, A. R. A. DA. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, v. 8, n. 1, p. 151–169, 2011.
 - FLAHERTY, K. T.; FISHER, D. E. New strategies in metastatic melanoma: oncogene-defined taxonomy leads to therapeutic advances. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 17, n. 15, p. 4922–8, 1 ago. 2011.

- FRATINI, F. et al. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 9, p. 839–843, 1 set. 2016.
- GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 6, p. 37–56, 1 dez. 2017. GAO, T. et al. The synthesis of graphene oxide functionalized with dithiocarbamate group and its prominent performance on adsorption of lead ions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 71, p. 426–432, 1 fev. 2017.
- GEALL, A. J. et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 36, p. 14604–9, 4 set. 2012.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 22 fev. 2007.
- HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 26, n. 1, p. 57–64, 1 jan. 2008.
- HANS, M.; LOWMAN, A. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 6, n. 4, p. 319–327, 1 ago. 2002.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 2, p. 265–273, 9 maio 2013.
- KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y.-W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41,

- n. 6, p. 1133–1139, 1 jul. 2008.
- LABALA, S. et al. Effective melanoma cancer suppression by iontophoretic co-delivery of STAT3 siRNA and imatinib using gold nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 525, n. 2, p. 407–417, 20 jun. 2017.
 - LAMBA, H.; SATHISH, K.; SABIKHI, L. Double Emulsions: Emerging Delivery System for Plant Bioactives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 8, n. 4, p. 709–728, 15 abr. 2015. LI, L. et al. Sodium diethyldithiocarbamate as a corrosion inhibitor of cold rolled steel in 0.5 M hydrochloric acid solution. *Corrosion Science*, v. 59, p. 249–257, 1 jun. 2012.
 - LINCE, F. et al. Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 89, n. 11, p. 2410–2419, 1 nov. 2011.
 - LIU, Q. et al. Targeted drug delivery to melanoma. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 127, p. 208–221, 1 mar. 2018. LOMAS, H. et al. Biomimetic pH Sensitive Polymersomes for Efficient DNA Encapsulation and Delivery. *Advanced Materials*, v. 19, n. 23, p. 4238–4243, 3 dez. 2007.
 - LUO, W. et al. Discovery of Beeswax as binding agent on a 6th-century BC Chinese Turquoise-inlaid Bronze sword. *Journal of Archaeological Science*, v. 39, n. 5, p. 1227–1237, 1 maio 2012.
 - MAKLED, S.; NAFEE, N.; BORAIE, N. Nebulized solid lipid nanoparticles for the potential treatment of pulmonary hypertension via targeted delivery of phosphodiesterase-5-inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 517, n. 1–2, p. 312–321, 30 jan. 2017.
 - MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer *Trends in*

- Pharmacological Sciences, 2009.
- MALE, D.; GROMNICOVA, R.; MCQUAID, C. Gold Nanoparticles for Imaging and Drug Transport to the CNS. *International Review of Neurobiology*, v. 130, p. 155–198, 1 jan. 2016.
 - MAZUR, K. L. et al. Diethyldithiocarbamate loaded in beeswax-copaiba oil nanoparticles obtained by solventless double emulsion technique promote promastigote death in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018.
 - MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 219, p. 27–53, 1 maio 2015.
 - MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 83–101, 1 dez. 2012. MERCK/SIGMA-ALDRICH. IR Spectrum Table & Chart | Sigma-Aldrich. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>>. Acesso em: 6 set. 2018.
 - MILANOVIC, J. et al. Blend of natural waxes as a matrix for aroma encapsulation. *Facta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology*, v. 15, n. 2, p. 103–111, 2017. MÜLLER, R. H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 161–177, 3 jul. 2000.
 - MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. S131–S155, 1 nov. 2002.

- MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, v. 3, n. 4, p. 793–829, 4 nov. 2011.
- MUSCHIOLIK, G. Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 12, n. 4–5, p. 213–220, 1 out. 2007.
- OMWOYO, W. et al. Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 3865, ago. 2014.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 21 jan. 2009.
- PATIL, P. S. et al. Synthesis, growth, and characterization of 4-OCH₃-4'-nitrochalcone single crystal: A potential NLO material. *Journal of Crystal Growth*, v. 297, n. 1, p. 111–116, 15 dez. 2006.
- REIS ANTUNES JUNIOR, O. et al. Preparation, physicochemical characterization and antioxidant activity of diphenyl diselenide-loaded poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 39, p. 176–185, 1 jan. 2017.
- ROMPICHARLA, S. V. K. et al. Formulation optimization, characterization, and evaluation of in vitro cytotoxic potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles for improved anticancer activity. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 208, p. 10–18, 1 nov. 2017.
- SALEH, J. Murine models of melanoma. *Pathology - Research and Practice*, v. 214, n. 9, p. 1235–1238, 1 set. 2018.
- SARMENTO, B. et al. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 2, n. 4, p. 743–9, 2007.

- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 15 set. 2018.
- SILVA, B. F. B.; RODRÍGUEZ-ABREU, C.; VILANOVA, N. Recent advances in multiple emulsions and their application as templates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 25, p. 98–108, 1 out. 2016.
- SILVERSTEIN, R. M. et al. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th Edition. [s.l: s.n.].
- TAN, X. et al. Systematic identification of synergistic drug pairs targeting HIV. *Nature biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 1125–30, nov. 2012.
- VAN BUTSELE, K.; JÉRÔME, R.; JÉRÔME, C. Functional amphiphilic and biodegradable copolymers for intravenous vectorisation. *Polymer*, v. 48, n. 26, p. 7431–7443, 13 dez. 2007.
- VEHRING, R. *Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying*. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 5, p. 999–1022, 28 maio 2008.
- WOLINSKY, J. B.; COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of Controlled Release*, v. 159, n. 1, p. 14–26, 10 abr. 2012.
- WOODMAN, S. E. et al. New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 18, n. 5, p. 1195–200, 1 mar. 2012.
- YAN, P. et al. Removal performances and mechanisms of action towards ethylenediaminetetraacetic acid nickel (II) salt by dithiocarbamate compounds having different carbon chain lengths. *Journal of Cleaner Production*, v. 122, p. 308–314, 20 maio 2016.

- YASIR, M.; SARA, U. V. S. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: in vitro drug release and pharmacokinetics evaluation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 4, n. 6, p. 454–463, 1 dez. 2014.
- YONCHEVA, K. et al. Optimization and in-vitro/in-vivo evaluation of doxorubicin-loaded chitosan-alginate nanoparticles using a melanoma mouse model. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 556, p. 1–8, 10 fev. 2019.
- ZHAO, L. et al. Engineering and delivery of nanocolloids of hydrophobic drugs. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 249, p. 308–320, 1 nov. 2017.
- ZHENG, F. et al. Antitumor efficacy of doxorubicin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite–poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Polym. Chem.*, v. 4, n. 4, p. 933–941, 22 jan. 2013.
- ZHOU, K. et al. Tunable, Ultrasensitive pH-Responsive Nanoparticles Targeting Specific Endocytic Organelles in Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 50, n. 27, p. 6109–6114, 27 jun. 2011.

REIVINDICAÇÕES

1- NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE CERA DE ABELHA COM ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACO HIDROFÍLICO E FÁRMACO LIPOFÍLICO VIA DUPLA EMULSÃO LIVRE DE SOLVENTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO SINÉRGICO DE MELANOMA CUTÂNEO E PROCESSO DE OBTENÇÃO, caracterizado por uma nanopartícula que compreende pelo menos um fármaco hidrofílico, pelo menos um fármaco lipofílico e pelo menos um veículo farmacêuticamente aceitável, associados a um processo de dupla emulsão sem a utilização de solvente orgânico visando a encapsulação simultânea de ambos os fármacos.

2- FÁRMACO HIDROFÍLICO E FÁRMACO LIPOFÍLICO, de acordo com a reivindicação 1 e caracterizado pelo veículo farmacêuticamente aceitável ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores farmacêuticamente aceitáveis, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de vias de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular.

3- PROCESSO de obtenção das nanopartículas de acordo com a reivindicação 1 e caracterizado pelas seguintes etapas:

a) - na primeira etapa, em um frasco de 15 ml, adiciona-se 0,45 g de cera de abelha branca e 0,045 g de lecitina de soja, sendo o recipiente colocado em um banho de água sobre uma chapa de aquecimento com agitação a 70°C, onde um agitador magnético é adicionado ao frasco e sua intensidade é regulada para 50 rpm, após a fusão e homogeneização da cera de abelha com a lecitina adiciona-se 0,42ml de uma solução de 4-

nitrochalcona em Crodamol GTCC (10 mg/ml) a mistura, formando a matriz lipídica da nanopartículas;

b) - na segunda etapa do processo ocorre a adição de 0,40 ml da fase aquosa, composta por uma solução contendo dietilditiocarbamato de sódio em água (20 mg/ml), ao frasco contendo a mistura descrita na primeira etapa, sendo que a mistura permanece sob aquecimento apenas o tempo necessário para homogeneização (30s) e então a mesma é submetida a dispersão ultrassônica com sonda por 15s com amplitude de 45%;

c) - imediatamente após a segunda etapa, uma solução contendo polissorbato 80 em água (90 mg/ml) é adicionada ao frasco contendo a mistura das etapas “a” e “b” e esta é então mantida no banho de água sob de aquecimento a 70°C por 10 min sob agitação magnética de 400 rpm, sendo que, decorrido o período de 10 min o material é novamente submetido à dispersão ultrassônica com sonda por 1 min (pulsos de 15 s on e 10 s off) com amplitude de 70%, onde, imediatamente após o término da dispersão ultrassônica o material contido no frasco é transferido para um béquer de 100 ml contendo 35 ml de água a 7°C sob agitação magnética de 400 rpm e permanece por 5 min até a completa solidificação das nanopartículas lipídicas.

FIG. 01

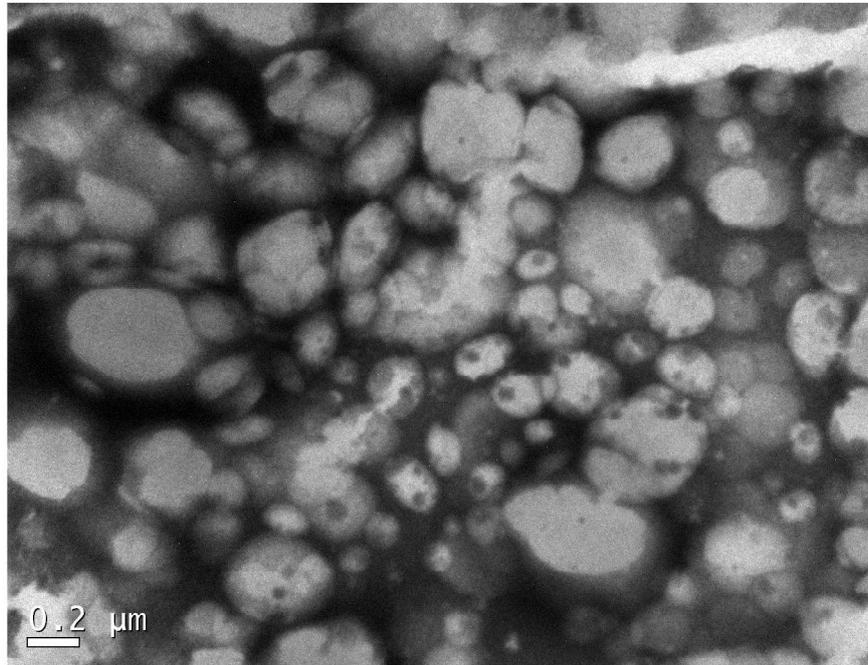


FIG. 02

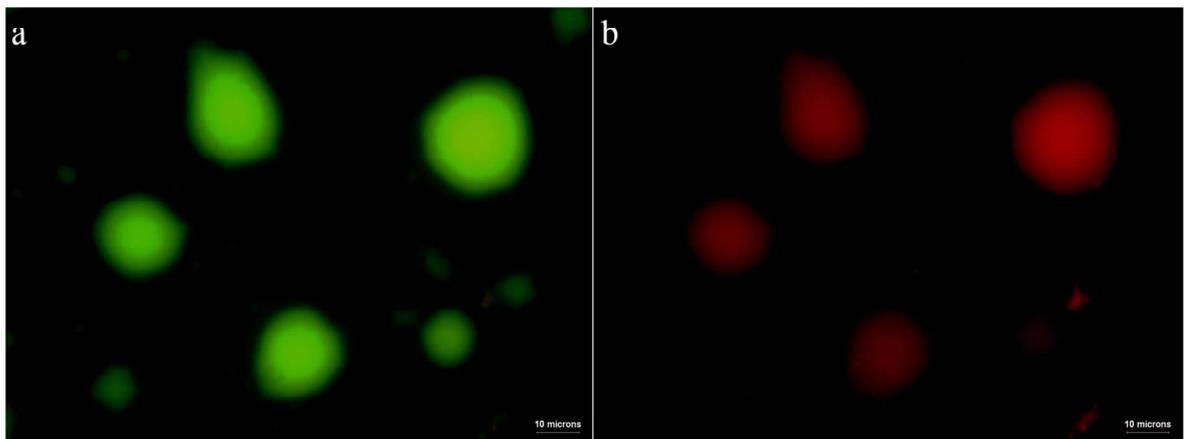


FIG. 03

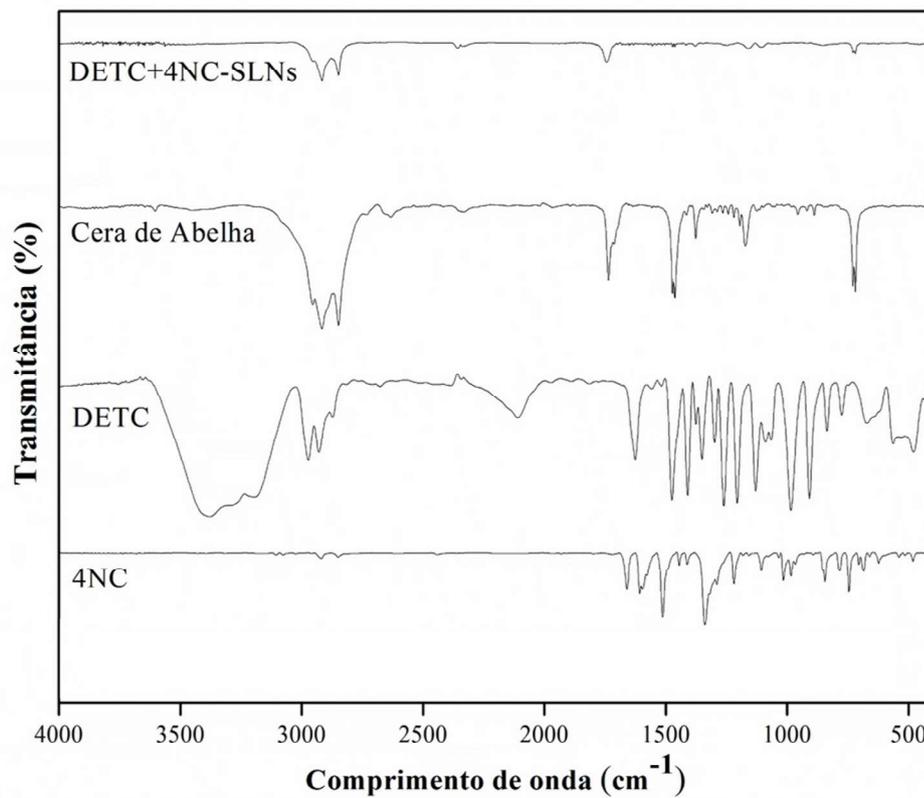


FIG. 04

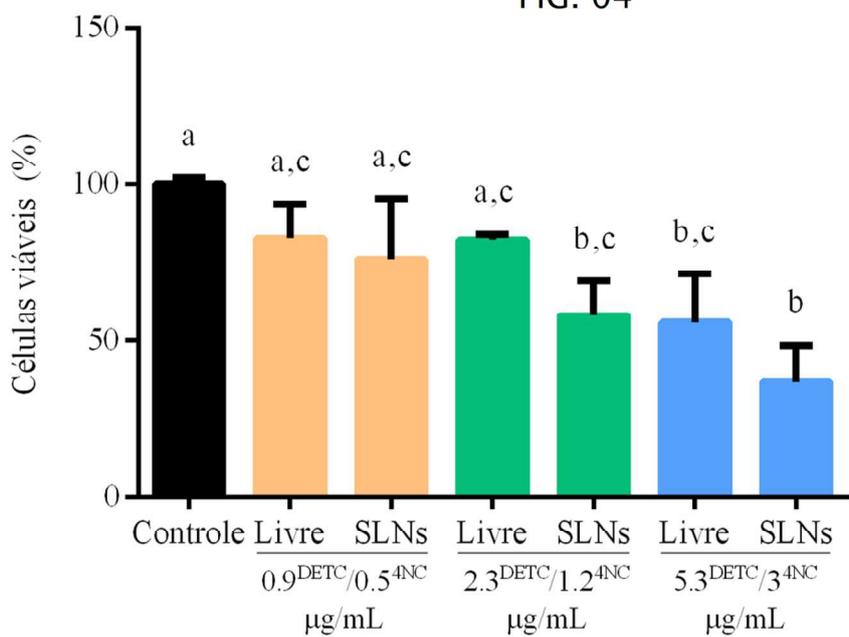


TABELA 01

4NC + DETC SLN	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Pré - liofilização	192,3 ± 1,2	0,2 ± ≤0,1	-52,6 ± 0,7
Pós - liofilização	212,9 ± 13,6	0,3 ± ≤0,1	-49,6 ± 4,8

RESUMO

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS DE CERA DE ABELHA COM ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACO HIDROFÍLICO E FÁRMACO LIPOFÍLICO VIA DUPLA EMULSÃO LIVRE DE SOLVENTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO SINÉRGICO DE MELANOMA CUTÂNEO E PROCESSO DE OBTENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma nanopartícula lipídica sólida de cera de abelha preparada pelo processo de dupla emulsão água/óleo/água, sem utilização de solvente orgânico, contendo simultaneamente na mesma nanoestrutura um fármaco hidrofílico e um fármaco lipofílico para tratamento terapêutico sinérgico de melanoma cutâneo, associados a um processo de dupla emulsão sem a utilização de solvente orgânico visando a encapsulação simultânea de ambos os fármacos.