REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102017004724-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102017004724-5

(22) Data do Depósito: 09/03/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 07/04/2020

(51) Classificação Internacional: A61K 47/44; A61K 31/704; A61K 31/513; A61K 31/282; A61K 131/00; A61K 9/127; A61P 35/00.

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO À BASE DE LIPÍDIOS VEGETAIS, CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO E USOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 46068425000133. Endereço: CIDADE UNIVERSITÁRIA "ZEFERINO VAZ", DISTRITO DE BARÃO GERALDO, CAMPINAS, SP, BRASIL(BR), 13083-970, Brasileira

(72) Inventor: WAGNER JOSÉ FÁVARO; JOEL GONÇALVES DE SOUZA; ALZIRA XAVIER PINTO DINI; MIRIAM DOS SANTOS MUNIZ; MIRIAN YOSHIKO MATSUMOTO; LUIZ ALBERTO BANDEIRA FERREIRA; MARCELO BISPO DE JESUS; NELSON EDUARDO DURAN CABALLERO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 09/03/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 28/10/2025

Assinado digitalmente por:
Gisela Aparecida Silva Nogueira
Diretora de Patentes Substituta

PROCESSO DE OBTENÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO À BASE DE LIPÍDIOS VEGETAIS, CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO E USOS.

Campo da invenção:

[1] A presente invenção se insere no campo de aplicação da ciência médica, mais especificamente na área de nanotecnologia, uma vez que se refere a carreadores lipídicos nanoestruturados à base de lipídios vegetais, seu processo de preparação e funcionalização, e seu uso farmacêutico e cosmecêutico, preferencialmente como carreadores de fármacos e ativos farmacêuticos para tratamento de células tumorais em diversos tecidos/órgãos do corpo, mais preferencialmente para tratamento do câncer de bexiga.

Fundamentos da invenção:

[2] O câncer de bexiga (CB) está entre os cinco tumores malignos mais comuns em todo mundo. A maioria (75%) dos CBs são primeiramente diagnosticados como não-músculo invasivos (CBNMI) nos estágios Ta, T1, e carcinoma *in situ* (CIS).

[3] A modalidade terapêutica mais amplamente utilizada para o tratamento de câncer de bexiga (CB) é baseada na administração intravesical do *Bacillus calmette-guérin* (BCG) associado à ressecção transuretral. Apesar do efeito antitumoral do BCG, um número significativo de pacientes submetidos a este tratamento apresentam intolerância e complicações potencialmente fatais. Além disso, pode haver complicações potencialmente fatais, como a infecção sistêmica por BCG. Por fim, 50% dos tumores de bexiga não-músculo invasivos (CBNMI) apresentam recorrência dentro de 4 anos após o tratamento e 11% dos casos apresentam fenótipo invasivo. Dessa forma, torna-se imprescindível propor novos

tratamentos que aumentem a eficácia do tratamento do CBNMI.

[4] Cientistas têm desenvolvido vários tipos de nanopartículas como carreadoras de fármacos para a terapia intravesical e obtiveram resultados positivos em estudos pré-clínicos, indicando que a utilização de nanopartículas no tratamento de câncer urotelial da bexiga urinária pode reduzir os efeitos secundários negativos e as taxas de recorrência. No entanto, as principais limitações destes sistemas são a instabilidade durante a instilação, a biodegradabilidade, o vazamento do fármaco e os efeitos colaterais adversos associados ao fármaco.

[5] Alguns documentos do estado da técnica descrevem processos de obtenção de nanopartículas funcionalizadas.

[6] O documento WO2010040194 se refere a nanopartículas poliméricas contendo um óleo (entre eles óleo de Buriti) e um filtro protetor UV para prevenção de doenças de pele e o método de preparação dessas partículas. Diferentemente, a presente invenção refere-se a um carreador lipídico nanoestruturado com preparação e composição diferentes. Além disso, ambos possuem funcionalidades e finalidades totalmente distintas, em que a presente invenção apresenta a funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados com a incorporação de fármacos com ação antitumoral.

[7] A tecnologia descrita no documento BR 10 2014 028002 2 se refere a carreadores lipídicos nanoestruturados compostos por copolímero tribloco, e a composição de dois lipídios sólidos (Cupuaçu e Lanolina) em associação com um lipídio líquido (óleo de Buriti) preparados por Homogeneização à alta pressão para a aplicação cosmética,

especialmente em cabelos. A invenção aqui proposta difere desse documento principalmente pelo fato da composição do carreador lipídico nanoestruturado ser dado pela associação de Murumuru com um diéster ácido adípico bis-digliceril poliaciladipato-2 ou Cupuaçu com bis-digliceril poliaciladipato-2, além da associação do surfactante. Os surfactantes utilizados foram Pluronic F68, um poloxâmero tribloco de natureza neutra em combinação com um surfactante de natureza catiônica, cloreto de Behentrimonium, na proporção de 50:50% ou Pluronic F68, um poloxâmero tribloco de natureza neutra em relação de 2,0% pela razão de solução total. Além disso, os métodos de preparação de ambos são diferentes e a funcionalização das nanopartículas carreadoras também, em que a presente invenção propõe um método de homogeneização à alta velocidade em Ultra-Turrax, com poucas etapas, para a preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados para a entrega de fármacos de ação antitumoral de alto espectro.

[8] Já o documento "*Optimization of 5-fluoracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer*" de YASSIN, Alaa et al (2010) se refere a uma formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com 5-fluorouracil para possível tratamento de câncer de colón. Tais nanopartículas foram preparadas por dupla emulsão/evaporação (a/o/a) do solvente, usando ésteres de triglicerídeo com lecitina de soja como parte lipídica. A invenção aqui proposta difere deste artigo principalmente pelo fato de que a presente partícula é um carreador lipídico nanoestruturado e a partícula do artigo corresponde a nanopartícula lipídica sólida com componentes de

propriedades completamente diferentes. Além disso, as nanopartículas lipídicas sólidas apresentadas no artigo foram preparadas por dupla emulsão com evaporação de solvente, tal método não garante reprodutibilidade. A liberação e estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas são menos estáveis e o processo de liberação de fármacos associados é mais rápida e não sustentada. Em contrapartida, as nanopartículas da presente invenção possuem maior estabilidade, carga e eficiência na liberação dos fármacos (liberação sustentada). Além disso, apresentam grande potencial para aplicação em tumores de bexiga urinária, uma vez que reduziram significativamente esses tumores.

[9] O documento PCT/BR2016/050087 descreve um método de preparação de carreadores lipídicos nanoestruturados composto pelos Lipídios sólidos (Murumuru+Bis-diglyceryl polyacyladipate-2) na proporção em massa entre eles variando de 50-90%, sendo a relação preferencial de 70:30%; Lipídio líquido (óleo de Buriti) na quantidade de 10-50% em massa, sendo a quantidade preferencialmente a quantidade de 20%, em relação à massa total de lipídios sólidos. Os estabilizantes utilizados foram de natureza catiônica da família dos cloretos de cetrimônio, Cloreto de Behentrimonium e cloreto de Hexadeciltrimetilamônio, preferencialmente os dois primeiros, na proporção 0,3-1,5%, com preferência para a quantidade de 0,7%. Os carreadores lipídicos nanoestruturados produzidos pela Invenção apresentam como pontos positivos em relação à tecnologia revelada em PCT/BR2016/050087, o fato de serem produzidos por uma técnica mecânica de fácil acesso, a Homogeneização à alta velocidade

em Ultra-Turrax e, a preparação de sistemas nanoestruturados com poucas etapas de preparação em relação aos encontrados no estado da técnica, o que faz com que a técnica seja altamente reprodutível e de fácil execução. Ademais ao fato das nanopartículas serem estabilizadas pela conjunção de surfactantes de naturezas diferentes (Catiônico/neutro), demonstrando uma adição à estabilidade e diminuição na citotoxicidade das partículas. Além disso, a invenção apresenta a funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados com a incorporação de fármacos com ação antitumoral de eficácia já catalogada e conhecida pela literatura (Doxorrubicina e 5-Fluoracil), além da incorporação de Complexo de Platina, que apresentam alta estabilidade no sistema nanoparticulado e alta incorporação dos fármacos às nanoestruturas. Adicionalmente, o sistema nanoparticulado apresentou baixa citotoxicidade pela carga e pelo tamanho reduzido.

[10] Portanto, nenhum documento do estado da técnica descreve carreadores lipídicos nanoestruturados, compostos pela mistura de dois lipídios sólidos com um lipídio líquido estabilizados em um sistema emulsionante por um surfactante ou uma mistura de surfactantes, incorporando um fármaco com ação antitumoral e utilizando a técnica de homogeneização à alta Velocidade, tal como proposto pela presente invenção.

Breve descrição da invenção:

[11] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de carreadores lipídicos nanoestruturados, compostos pela mistura de dois lipídios sólidos na faixa de proporção de 50%-90%, preferencialmente 70%:30%, em massa (Cupuaçu e bis-digliceril poliaciladipato-2 ou a mistura de

Murumuru e bis-digliceril poliaciladipato-2) com um lipídio líquido na faixa de 5-50%, preferencialmente 20% (óleo de Buriti) estabilizados em um sistema emulsionante por um surfactante, na faixa de proporção de 0,1-3,0%, preferencialmente 2,0% (Pluronic F68, poloxâmero tribloco de natureza não iônica) ou uma mistura de surfactantes, na faixa de proporção entre eles de 10-90%, preferencialmente 50:50%, e na quantidade preferencial de 0,8% pela razão de solução total (Pluronic F68 com cloreto de behentrimonium, surfactante de natureza catiônica), incorporando um fármaco com ação antitumoral na faixa de proporção de 1-20%, (Doxorrubicina ou 5-Fluoracil ou Complexo de Platina) e utilizando a técnica de Homogeneização à alta Velocidade, com velocidade na faixa de 5.000 a 20.000 rpm, para a preparação das nanopartículas funcionalizadas para aplicação no tratamento de células tumorais, principalmente funcionando como carreadores de fármacos e ativos farmacêuticos ou cosmecêuticos para tratamento de células tumorais em diversos tecidos/órgãos do corpo, mas preferencialmente para tratamento do câncer de bexiga.

Breve descrição das figuras:

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

[13] A Figura 1 A-F representam fotomicrografias dos tecidos das bexigas urinárias dos animais corados com Hematoxilina e Eosina tratados com NLC DOXO.

[14] A Figura 2 A-F representam fotomicrografias dos tecidos das bexigas urinárias dos animais corados com Hematoxilina e Eosina tratados com DOXO.

[15] A Figura 3 A-P representam fotomicrografias dos tecidos das bexigas urinárias dos animais corados com Hematoxilina e Eosina tratados com NCL-B, NCL/5-F e NCL/si-RNA.

[16] A Figura 4 A-H representam fotomicrografias dos tecidos das bexigas urinárias dos animais corados com Hematoxilina e Eosina tratadas com 5-FU.

Descrição detalhada da invenção:

[17] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção e funcionalização de carreadores lipídicos nanoestruturados à base de lipídios vegetais, o qual compreende as etapas de:

a) Realizar fusão de um lipídio vegetal sólido juntamente com o composto bis-digliceril poliaciladipato-2;

b) Adicionar de 5 a 50% de um lipídio vegetal líquido à fusão obtida em "a";

c) Adicionar, sob agitação, de 1 a 20% de um fármaco à composição obtida em "b";

d) Agitar até completa dispersão do fármaco;

e) Adicionar sob agitação uma solução aquosa compreendendo pelo menos um surfactante; e

f) Obter uma emulsão de nanopartículas.

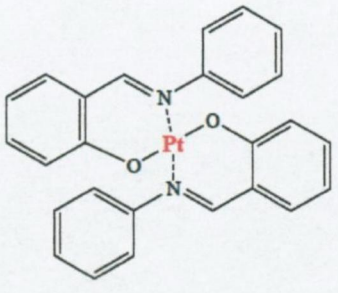
[18] Na etapa "a", o referido lipídio vegetal sólido é selecionado do grupo que compreende manteiga de cupuaçu ou manteiga de murumuru. A fusão do lipídio sólido ao bis-digliceril poliaciladipato-2 é realizada na proporção em massa entre eles de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, preferencialmente de 70:30%, até a fusão à temperatura na faixa entre 30 a 80°C. Quando o lipídio sólido for a manteiga de cupuaçu, a temperatura preferencial de fusão será de 70°C;

e quando for a manteiga de murumuru a temperatura preferencial de fusão será de 40°C.

1. A seguir, na etapa "b", adiciona-se de 5 a 50%, preferencialmente 20% de um lipídio vegetal líquido à mistura obtida na etapa "a", em que o referido lipídio líquido é selecionado do grupo que compreende óleo de açaí, andiroba, bacuri, babaçu, breu branco, castanha do Pará, copaíba, cumaru, maracujá, patauá, ojon, pracaxi, tucumã, coco e ucuuba, café, laranja eucalytus, orégano, preferencialmente o óleo de Buriti.

[19] Desse modo, na etapa "c", adiciona-se de 1 a 20% de um fármaco antitumoral à composição lipídica obtida na etapa "b", em que o referido fármaco é selecionado do grupo que consiste em doxorrubicina ou 5-Fluorouracil ou o complexo de platina. Ainda na etapa "c", a proporção preferencial de cada um dos fármacos é de 5% para a Doxorrubicina, 10% para 5-Fluorouracil, e 6% para o complexo de platina.

[20] É importante ressaltar que o referido fármaco complexo de platina possui fórmula química $C_{26}H_{20}N_2O_2Pt$ e estrutura química (I) representada a seguir.



(I)

[21] Após agitar até completa dispersão do fármaco, na etapa "e" adiciona-se de 0,1 a 3,0% de uma solução aquosa compreendendo pelo menos um surfactante selecionado do grupo

que compreende o copolímero tribloco de poli(etileno glico)-poli(propileno glicol)-poli(etileno glicol) - Pluronic F68, cloreto de Behentrimonium, ou uma mistura desses na faixa de proporção entre eles (Pluronic: cloreto de Behentrimonium) de 10 a 90%, em relação à solução total, preferencialmente 50:50%.

[22] Ainda na etapa "e", a adição do surfactante é realizada sob agitação mecânica, em uma rotação na faixa de 5.000 a 20.000 rpm, preferencialmente 15.000 rpm, por 30 a 50 minutos, preferencialmente 40 minutos, utilizando a técnica de Homogeneização à alta Velocidade em Ultra- Turrax.

[23] Ainda, o Pluronic F68 é usado somente com o complexo de platina, preferencialmente em relação de 2,0% pela razão de solução total, sendo previamente preparado separadamente e sob uma temperatura na faixa entre 30 a 80°C, preferencialmente de 40°C. Nesse caso, a agitação mecânica é em rotação preferencial de 10.000 rpm.

[24] Já a mistura de Pluronic F68 com cloreto de Behentrimonium é usada com os fármacos doxorrubicina ou 5-Fluorouracil, preferencialmente em relação de 0,8% pela razão de solução total, previamente preparados separadamente e sob uma temperatura na faixa entre 30 a 80°C, preferencialmente de 70°C. Nesse caso, a agitação mecânica é em rotação preferencial de 9.500 rpm.

[25] Destarte, na etapa "f", obtém-se uma emulsão de nanopartículas lipídicas sólidas do tipo carreadores lipídicos nanoestruturados de fármacos e ativos farmacêuticos ou cosmecêuticos para tratamento de células tumorais em diversos tecidos/órgãos do corpo.

[26] Portanto, adicionalmente, a presente invenção

refere-se a um carreador lipídico nanoestruturado (nanocarreador), a qual compreende:

- de 50% a 90% de dois lipídeos sólidos, na relação entre os lipídios sólidos;

- de 5 a 50% de um lipídio líquido, em relação à proporção de lipídios sólidos;

- de 0,1 a 3,0% de pelo menos um surfactante, em relação à solução total; e

- de 1 a 20% de um fármaco, em relação à massa total dos componentes acima.

[27] Em que os referidos lipídios sólidos são selecionados dos grupos que compreendem manteiga de cupuaçu com bis-digliceril poliaciladipato-2, ou manteiga de murumuru com bis-digliceril poliaciladipato-2; na proporção em massa entre eles variando de 50% a 90%, tais como 50%:50% ou 60%:40% ou 70%:30% ou 80%:20% ou 90%:10%, preferencialmente 70%:30%; em que preferencialmente utiliza-se 20% de óleo de buriti como lipídio líquido em relação à massa total de lipídios sólidos.

[28] Os lipídios são estabilizados em um sistema emulsionante por: um surfactante, na faixa de proporção de 0,1-3,0%, preferencialmente 2,0%, em relação à quantidade em massa de solução total; ou por uma mistura de surfactantes, na faixa de proporção em massa entre eles variando de 10% a 90%, preferencialmente 50%:50%, e na quantidade preferencial de 0,8% pela razão da massa de solução total.

[29] O referido surfactante é selecionado do grupo de de surfactantes do tipo poloxâmero tribloco de natureza não iônica que compreende preferencialmente, copolímero triboco de poli(etileno glico)-poli(propileno glicol)-poli(etileno

glicol) - o pluronic F68; e a mistura de surfactantes compreender um surfactante de natureza não iônica com um surfactante de natureza catiônica, preferencialmente, o poli(etileno glico)-poli(propileno glicol)-poli(etileno glicol) - Pluronic F68, com cloreto de Behentrimonium.

[30] O fármaco incorporado é selecionado do grupo de fármacos com ação antitumoral que compreende preferencialmente Doxorrubicina ou 5-Fluorouracil ou complexo de Platina.

[31] A proporção preferencial de cada um dos fármacos é de 5% para a Doxorrubicina, 10% para 5-fluorouracil, e 6% para o complexo de platina, em relação à massa total.

[32] Ainda, os referidos nanocarreadores possuem tamanho na faixa de 130 a 220 nm; superfície carregada positivamente com Potencial Zeta na faixa de +50,0 a + 80,0 mV ou superfície carregada negativamente com Potencial Zeta na faixa de -40,0 a -20,0 mV, conforme variações da presente invenção; e tempo de estabilidade de pelo menos 40 dias.

[33] Assim, os nanocarreadores apresentam menor tamanho e potencial zeta menor para diminuir a citotoxicidade quando comparados ao estado da técnica.

[34] Preferencialmente, o nanocarreador com superfície carregada positivamente deve compreender 70:30% em massa de manteiga de cupuaçu com bis-digliceril poliaciladipato-2 (relação entre lipídios sólidos); 20% de óleo de buriti em relação aos lipídios sólidos; 5% ou 10% de Doxorrubicina ou 5-Fluorouracil, respectivamente, em relação à massa total da preparação; e 0,8%(em relação à solução total) de Pluronic F68 com cloreto de Behentrimonium (50:50%).

[35] Já para o nanocarreador com superfície carregada

negativamente, preferencialmente, o mesmo deve compreender 70:30% em massa de manteiga de murumuru com bis-digliceril poliaciladipato-2; 20% de óleo de buriti em relação aos lipídios sólidos; 6% do fármaco complexo de platina em relação à massa total da preparação; e 2% (em relação à solução total) do surfactante Pluronic F68.

[36] Preferencialmente, as referidas nanopartículas lipídicas sólidas do tipo carreador lipídico nanoestruturado (nanocarreadores) são obtidas conforme processo aqui descrito.

[37] Um ponto de grande relevância do uso do sistema formado a partir da manteiga de cupuaçu consiste na associação de dois tensoativos, um de natureza catiônica e ou outro de natureza neutra. A grande vantagem dessa associação foi possibilitar a redução em torno de 20% do tensoativo catiônico, possibilitando a redução da citotoxicidade da nanopartícula e a incorporação do fármaco em cultura de células tumorais de câncer de bexiga, e a inserção do tensoativo neutro para auxiliar a formação e garantir a estabilidade das nanopartículas.

[38] Portanto, adicionalmente, a presente invenção refere-se ao uso dos nanocarreadores conforme detalhado anteriormente para ser utilizado no preparo/veiculação de um medicamento para tratar células tumorais em diversos tecidos/órgãos do corpo.

[39] Assim, os referidos nanocarreadores são utilizados como carreadores de fármacos e ativos farmacêuticos para tratamento de células tumorais, preferencialmente células tumorais de câncer de bexiga.

[40] Adicionalmente, devido à alta estabilidade dos

ativos presentes no sistema nanoparticulado e pela baixa citotoxicidade apresentada por ele, o nanocarreador pode também ser aplicado para carreamento, tanto em vias internas quanto externas, de ativos para aplicação cosmética e cosmecêutica.

[41] Para tal, o referido fármaco é preferencialmente selecionado do grupo de ativos para aplicação cosmética que compreende vitaminas, ativos hidratantes, emolientes, ativos antiidade, anticelulíticos e ativos de proteção solar.

[42] Para melhor entendimento da presente invenção, a seguir são apresentados exemplos de preparações.

Exemplos da Invenção:

- Exemplo 1:

[43] Primeiramente realizou-se a fusão dos dois lipídios sólidos do grupo compreendido por manteiga de Cupuaçu (p.f. 28,4 -29,7°C) e bis-digliceril poliaciladipato-2 (p.f. ao redor de 35°C), na proporção em massa entre eles de 70:30%, até a fusão à uma temperatura na faixa entre 30-80°C, preferencialmente de 70°C.

[44] A seguir, adicionou-se o lipídio líquido óleo de Buriti na faixa de 5-50%(em relação à massa de lipídios sólidos), preferencialmente 20%, aos lipídios sólidos.

[45] Realizou-se a adição do fármaco (Doxorrubicina e/ou 5-Fluorouracil), na faixa de proporção de 1-20%(em relação à massa total), preferencialmente 5% para a Doxorrubicina e 10% para 5-Fluoracil, à composição lipídica e manteve-se sob agitação até a completa dispersão do fármaco (no caso do 5-Fluorouracil ainda se notou a presença de pequenos cristais na mistura lipídica).

[46] A seguir, realizou-se a adição da composição

obtida à uma solução aquosa contendo uma mistura de surfactantes, na faixa de proporção entre eles de 10-90%, preferencialmente 50:50% (Pluronic, poloxâmero tribloco de natureza não iônica, com cloreto de Behentrimonium, surfactante de natureza catiônica) e na faixa de proporção de 0,1-3,0%, preferencialmente em relação de 0,8% pela razão de solução total, previamente preparados separadamente e sob uma temperatura na faixa entre 30-80°C, preferencialmente de 70°C; sob agitação mecânica em Ultra-Turrax em uma rotação na faixa de 5.000-20.000 rpm, preferencialmente 9.500 rpm, por cerca de 30-50 minutos, preferencialmente 40 minutos formando uma emulsão de nanopartículas.

[47] Os nanocarreadores obtidos possuem tamanho na faixa de 170-220 nm, superfície carregada positivamente com Potencial Zeta na faixa de +50,0 à + 80,0 mV e tempo de estabilidade de cerca de 50 dias.

- Exemplo 2:

[48] Primeiramente, realizou-se a fusão dos dois lipídios sólidos do grupo compreendido por manteiga de Murumuru (p.f 33,0-35,0°C) e bis-digliceril poliaciladipato-2 (p.f. ao redor de 35°C), na proporção em massa entre eles de 70:30%, até a fusão à uma temperatura na faixa entre 30-80°C, preferencialmente de 40°C.

[49] A seguir, realizou-se a adição do lipídio líquido óleo de Buriti na faixa de 5-50%, preferencialmente 20%, aos lipídios sólidos. Seguido da adição do fármaco (Complexo de Platina), na faixa de proporção de 1-20%, preferencialmente 6%, à composição lipídica e manteve-se sob agitação até a completa dispersão do fármaco.

[50] A seguir, realizou-se a adição da composição

obtida à uma solução aquosa contendo um surfactante (Pluronic F68, poloxâmero tribloco de natureza não iônica) e na faixa de proporção de 0,1-3,0%, preferencialmente em relação de 2,0% pela razão de solução total, previamente preparado separadamente e sob uma temperatura na faixa entre 30-80°C, preferencialmente de 40°C; sob agitação mecânica em Ultra-Turrax em uma rotação na faixa de 5.000-20.000 rpm, preferencialmente 10.000 rpm, por cerca de 30-50 minutos, preferencialmente 40 minutos formando uma emulsão de nanopartículas.

[51] Os nanocarreadores obtidos possuem tamanho na faixa de 130-200 nm, superfície carregada negativamente com Potencial Zeta na faixa de -40,0 à -20,0 mV e tempo de estabilidade de cerca de 40 dias.

Testes Realizados:

[52] Com relação ao uso do BCG para o tratamento de CBNMI, avaliou-se previamente seu efeito e foi constatado uma atividade não promissora, sendo que 100% dos animais tratados apresentaram lesões malignas. Além disso, 40% das lesões foram do tipo Carcinoma Papilífero Alto Grau (pTa) e 60% das lesões foram Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1) (Tabela 1).

Tabela 1 - Histopatologia e estadiamento dos tumores de diferentes grupos experimentais.

Metaplasia Escamosa e Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	Carcinoma Papilífero Alto Grau (pTa)	Carcinoma Papilífero Baixo Grau (pTa)	Carcinoma *in situ* (pTis)	Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau	Hiperplasia Papilífera com focos inflamatórios	Hiperplasia Papilífera	Normal	Histopatologia
-	-	-	-	-	-	-	-	5 (100%)	Controlen=5
-	-	**3 (40%)**	**2 (40%)**	**1 (20%)**	-	-	-	-	MNU (Câncer)n=5
-	1 (20%)	2 (40%)	-	-	-	-	1 (25%)	-	DOXO n=4
1 (20%)	**1 (20%)**	**2 (40%)**	**1 (20%)**	-	-	-	-	-	NCL-B n=5
-	-	-	2 (40%)	1 (20%)	-	-	2 (40%)	-	NCL/siRNAN=5
-	**1 (20%)**	**2 (40%)**	**1 (20%)**	-	-	-	**1 (20%)**	-	NCL/DOXOn=5
-	3 60%)	2 (40%)	-	-	-	-	-	-	BCG
		3 (60%)			1 (20%)		1 (20%)		5-FU
-	1 (20%)	1 (20%)	-	-	-	2 (40%)	1 (20%)	-	NCL/5-FU n=5
Malígna	Malígna	Malígna	Malígna	Malígna	Pré-malígna	Benigna	Benigna	-	Tipo Lesão

[53] Quanto ao uso da Doxorrubicina para o tratamento de CBNMI, estudos prévios com uma formulação comercial (Doxil®), utilizando uma dose do fármaco equivalente a 3,0 mg/Kg, administrado por via intraperitoneal, demonstraram que 20% dos animais apresentaram lesões benignas e 80% lesões malignas do tipo Carcinoma Papilar *in situ*.

[54] Os resultados com o uso de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) com Doxorrubicina desenvolvidos no laboratório evidenciaram que 20% dos animais apresentaram lesões benignas (hiperplasia papilífera) (Figura 1C e 1D) e 80% lesões malignas. Por outro lado, considerando as lesões malignas, 40% delas foram lesões do tipo Carcinoma Papilífero Alto Grau (pTa) (Figura 1E e 1F), 20% Carcinoma Papilífero baixo Grau (pTa) e 20% lesões do tipo Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1). Vale destacar que no caso de tumores CIS refratários à imunoterapia com BCG, a Valrubicina, um análogo semissintético da doxorrubicina, o único medicamento aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento desta condição mostrou efetividade em menos de 10% dos pacientes tratados em dois anos e ineficácia em casos de estadio T1. As imagens da Figura 1A e 1B representam o controle sadio, em que se pode observar o urotélio normal.

[55] Experimentos realizados com a administração da doxorrubicina livre, ou seja, não incorporada às nanopartículas, evidenciaram que 25% dos animais apresentaram lesões do tipo hiperplasia papilífera, 50% carcinoma papilífero de alto grau (pTa) (Figura 2E e 2F) e 25% carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (Figura 2C e 2D). As imagens da Figura 2A e 2B representam o grupo

controle sadio, em que se pode observar o urotélio normal.

[56] Além do uso de doxorrubicina incorporada às nanopartículas, foi empregado o NLC com siRNA para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Os resultados evidenciaram que 40% dos animais apresentaram lesões benignas (hiperplasia papilífera) e 60% lesões malignas. Entretanto, quanto às lesões malignas, 33,3% delas foram lesões do tipo Carcinoma papilar in situ (pTis) e 66,7% lesões do tipo Carcinoma Papilífero Baixo Grau (pTa) (Tabela 1 e Figura 3).

[57] Na Figura 3, estão representados apenas as lesões de maior frequência de cada grupo. Em I e J é observado outra lesão pTa de alto grau no grupo tratado com CLN-B. O grupo CLN/5-FU mostra em K e L uma hiperplasia papilífera com focos inflamatórios (seta). O grupo CLN/siRNA apresenta em M e N uma hiperplasia papilífera; e em O e P um pTa de baixo grau.

[58] Nesse sentido, pode-se inferir que o uso de NLC com siRNA reduziu a agressividade do CBNMI em relação ao uso da formulação comercial (Doxil®).

[59] Por fim, o fármaco 5-fluoracil foi incorporado ao sistema NLC e o efeito antitumoral avaliado *in vivo*. Os resultados demonstraram que o tratamento resultou em 60% de lesões benignas e 40% de lesões malignas. Paralelamente, o tratamento com o fármaco na forma não encapsulada resultou em 20% de lesões benignas, 20% de de lesões pré-malignas e 60% de lesões malignas (Tabela 1 e Figura 4).

[60] Na Figura 4 estão representados apenas as lesões de maior frequência de cada grupo. Em A e B está representado o animal controle sadio, onde é identificado o urotélio normal. O grupo controle câncer, em C e D está apresentando

um carcinoma papilífero de alto grau (pTa); em E e F foi observado carcinoma *in situ* (pTis). O grupo tratado com 5-FU está representado em G e H, mostrando também uma lesão tipo pTa de alto grau.

[61] Portanto, os carreadores lipídicos nanoestruturados produzidos pela presente invenção apresentam como pontos positivos a eficácia comprovada da incorporação de fármacos com ação antitumoral, conforme testes apresentados, além dos carreadores apresentarem menor tamanho e potencial zeta menor para diminuir a citotoxicidade, apresentando assim, grande potencial para aplicação em tumores de bexiga urinária, uma vez que reduziram significativamente esses tumores.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção e funcionalização de carreadores lipídicos nanoestruturados à base de lipídios vegetais **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

a) Realizar fusão de manteiga de cupuaçu ou manteiga de murumuru juntamente com o composto bis-digliceril poliaciladipato-2;

b) Adicionar de 5 a 50% de óleo de buriti à fusão obtida em "a";

c) Adicionar, sob agitação, de 1 a 20% de doxorrubicina ou 5-fluorouracil ou complexo de platina, à composição obtida em "b";

d) Agitar até completa dispersão do fármaco;

e) Adicionar, sob agitação em ultra-turrax com rotação na faixa de 5000-200000 rpm, durante o tempo de 30 – 50 minutos, uma solução aquosa compreendendo poloxâmero tribloco não iônico; e

f) Obter uma emulsão de nanopartículas.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "a", o referido lipídio vegetal sólido ser selecionado do grupo que compreende manteiga de cupuaçu; e manteiga de murumuru.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "a", a fusão do lipídio sólido ao bis-digliceril poliaciladipato-2 ser realizada na proporção em massa entre eles de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, até a fusão.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "a", a fusão do lipídio

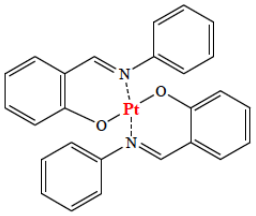
sólido ao bis-digliceril poliaciladipato-2 ser realizada, preferencialmente, na proporção de 70:30%, até a fusão à temperatura na faixa entre 30 a 80°C, sendo que quando o lipídio sólido for a manteiga de cupuaçu, a temperatura preferencial de fusão será de 70°C; e quando for a manteiga de murumuru a temperatura preferencial de fusão será de 40°C.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "b", adicionar preferencialmente 20% de um lipídio vegetal líquido à mistura obtida na etapa "a", em que o referido lipídio líquido é selecionado do grupo que compreende óleo de açaí, andiroba, bacuri, babaçu, breu branco, castanha do Pará, copaíba, cumaru, maracujá, patauá, ojon, pracaxi, tucumã, coco, ucuuba; café, laranja eucalytus, e orégano; preferencialmente o óleo de Buriti.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "c", o referido fármaco ser selecionado do grupo de fármacos antitumorais que compreende doxorrubicina, 5-Fluorouracil, e o complexo de platina.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "c", a proporção preferencial de cada um dos fármacos ser de 5% para a Doxorrubicina, 10% para 5-Fluorouracil, e 6% para o complexo de platina.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato do fármaco complexo de platina ($C_{26}H_{20}N_2O_2Pt$) e ter a fórmula estrutural



(I).

9. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de, alternativamente, o referido fármaco ser selecionado do grupo de ativos para aplicação cosmética que compreende vitaminas, ativos hidratantes, emolientes, ativos antiidade, anticelulíticos e ativos de proteção solar.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "e", adicionar de 0,1 a 3,0% de uma solução aquosa compreendendo pelo menos um surfactante selecionado do grupo que compreende o copolímero triboco de poli(etileno glico)-poli(propileno glicol)-poli(etileno glicol) - poloxâmero tribloco não iônico, cloreto de Behentrimonium, ou uma mistura desses na faixa de proporção entre eles (poloxâmero tribloco não iônico: cloreto de Behentrimonium) de 10 a 90%,em relação à solução total, preferencialmente 50:50%.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "e", a adição do surfactante ser realizada sob agitação em uma rotação na faixa de 5.000 a 20.000 rpm, preferencialmente 15.000 rpm, por 30 a 50 minutos, preferencialmente 40 minutos, utilizando a técnica de homogeneização à alta velocidade.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato do copolímero triboco de poli(etileno glico)-poli(propileno glicol)-poli(etileno glicol) - poloxâmero tribloco não iônico, ser usado com o complexo de platina, preferencialmente em relação de 2,0% pela razão de solução total, sendo previamente preparado separadamente e sob uma temperatura na faixa entre 30 a 80°C, preferencialmente de 40°C, em que a agitação mecânica é em

rotação preferencial de 10.000 rpm.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato da mistura de poloxâmero tribloco não iônico com cloreto de Behentrimonium ser usada com os fármacos doxorrubicina ou 5-Fluorouracil, preferencialmente em relação de 0,8% pela razão de solução total, previamente preparados separadamente e sob uma temperatura na faixa entre 30 a 80°C, preferencialmente de 70°C, em que a agitação é em rotação preferencial de 9.500 rpm.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "f", ser obtida uma emulsão de nanopartículas lipídicas sólidas do tipo carreadores lipídicos nanoestruturados de fármacos e ativos farmacêuticos ou cosmecêuticos.

15. Carreador lipídico nanoestruturado **caracterizado** por ser obtido de acordo com a reivindicação 1 e compreender:

- de 50% a 90% de manteiga de cupuaçu com bis-digliceril poliaciladipato ou manteiga de murumuru com bis-digliceril poliaciladipato-2;

- de 5 a 50% de óleo de buriti, em relação à proporção de manteiga de cupuaçu ou manteiga de murumuru e bis-digliceril poliaciladipato;

- de 0,1 a 3,0% de poloxâmero tribloco não iônico, em relação à solução total; e

- de 1 a 20% de doxorrubicina ou 5-fluorouracil ou complexo de platina, em relação à massa total dos componentes acima.

16. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato dos referidos lipídeos sólidos serem selecionados dos grupos que

compreendem manteiga de cupuaçu com bis-digliceril poliaciladipato-2, ou manteiga de murumuru com bis-digliceril poliaciladipato-2; na proporção em massa entre eles variando de 50% a 90%, tais como 50%:50% ou 60%:40% ou 70%:30% ou 80%:20% ou 90%:10%, preferencialmente 70%:30%.

17. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato do referido lipídio líquido ser, preferencialmente, 20% de óleo de buriti em relação à massa total de lipídios sólidos.

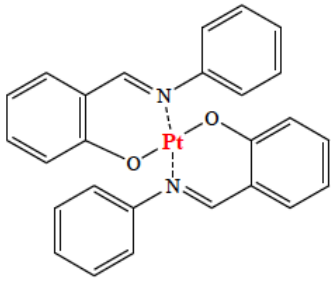
18. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato dos lipídios serem estabilizados em um sistema emulsionante por um surfactante, na faixa de proporção de 0,1-3,0%, preferencialmente 2,0%, em relação à quantidade em massa de solução total; ou por uma mistura de surfactantes, na faixa de proporção em massa entre eles variando de 10% a 90%, preferencialmente 50%:50%, e na quantidade preferencial de 0,8% pela razão da massa de solução total.

19. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 15 ou 18, **caracterizado** pelo fato do surfactante ser selecionado do grupo de surfactantes do tipo poloxâmero tribloco de natureza não iônica que compreende preferencialmente, copolímero triboco de poli(etileno glico)-poli(propileno glicol)-poli(etileno glicol) - poloxâmero tribloco não iônico; e a mistura de surfactantes compreender um surfactante de natureza não iônica com um surfactante de natureza catiônica, preferencialmente, o poli(etileno glico)-poli(propileno glicol)-poli(etileno glicol) - poloxâmero tribloco não iônico, com cloreto de Behentrimonium.

20. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato do referido fármaco incorporado ser selecionado do grupo de fármacos com ação antitumoral que compreende preferencialmente doxorrubicina ou 5-Fluorouracil ou complexo de Platina.

21. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato da proporção preferencial de cada um dos fármacos ser de 5% para a doxorrubicina, 10% para 5-fluorouracil, e 6% para o complexo de platina, em relação à massa total da preparação.

22. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato do fármaco complexo de platina ($C_{26}H_{20}N_2O_2Pt$) e ter a fórmula estrutural



(I).

23. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 22, **caracterizado** pelo fato dos referidos nanocarreadores possuírem tamanho na faixa de 130 a 220 nm; superfície carregada positivamente com Potencial Zeta na faixa de +50,0 a + 80,0 mV ou superfície carregada negativamente com Potencial Zeta na faixa de -40,0 a -20,0 mV; e tempo de estabilidade de pelo menos 40 dias.

24. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato do nanocarreador com superfície carregada positivamente compreender, preferencialmente, 70:30% em massa de manteiga de cupuaçu com bis-digliceril poliaciladipato-2; 20% de óleo de buriti

em relação aos lipídios sólidos; 5% ou 10% de Doxorrubicina ou 5-Fluorouracil, respectivamente; e 0,8% (em relação à solução total) de poloxâmero tribloco não iônico com cloreto de Behentrimonium (50:50%).

25. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato do nanocarreador com superfície carregada negativamente, preferencialmente, compreender 70:30% em massa de manteiga de murumuru com bis-digliceril poliaciladipato-2; 20% de óleo de buriti em relação aos lipídios sólidos; 6% do fármaco complexo de platina em relação à massa total da preparação; e 2% (em relação à solução total) do surfactante poloxâmero tribloco não iônico.

26. Carreador lipídico nanoestruturado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 25, **caracterizado** pelo fato de, preferencialmente, serem obtidas conforme processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

27. Uso do carreador lipídico nanoestruturado conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 26, **caracterizado** pelo fato de ser no preparo de um medicamento para tratar células tumorais em diversos tecidos/órgãos do corpo.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de ser aplicado para carreamento de fármacos e ativos farmacêuticos para tratar células tumorais, preferencialmente células tumorais de câncer de bexiga.

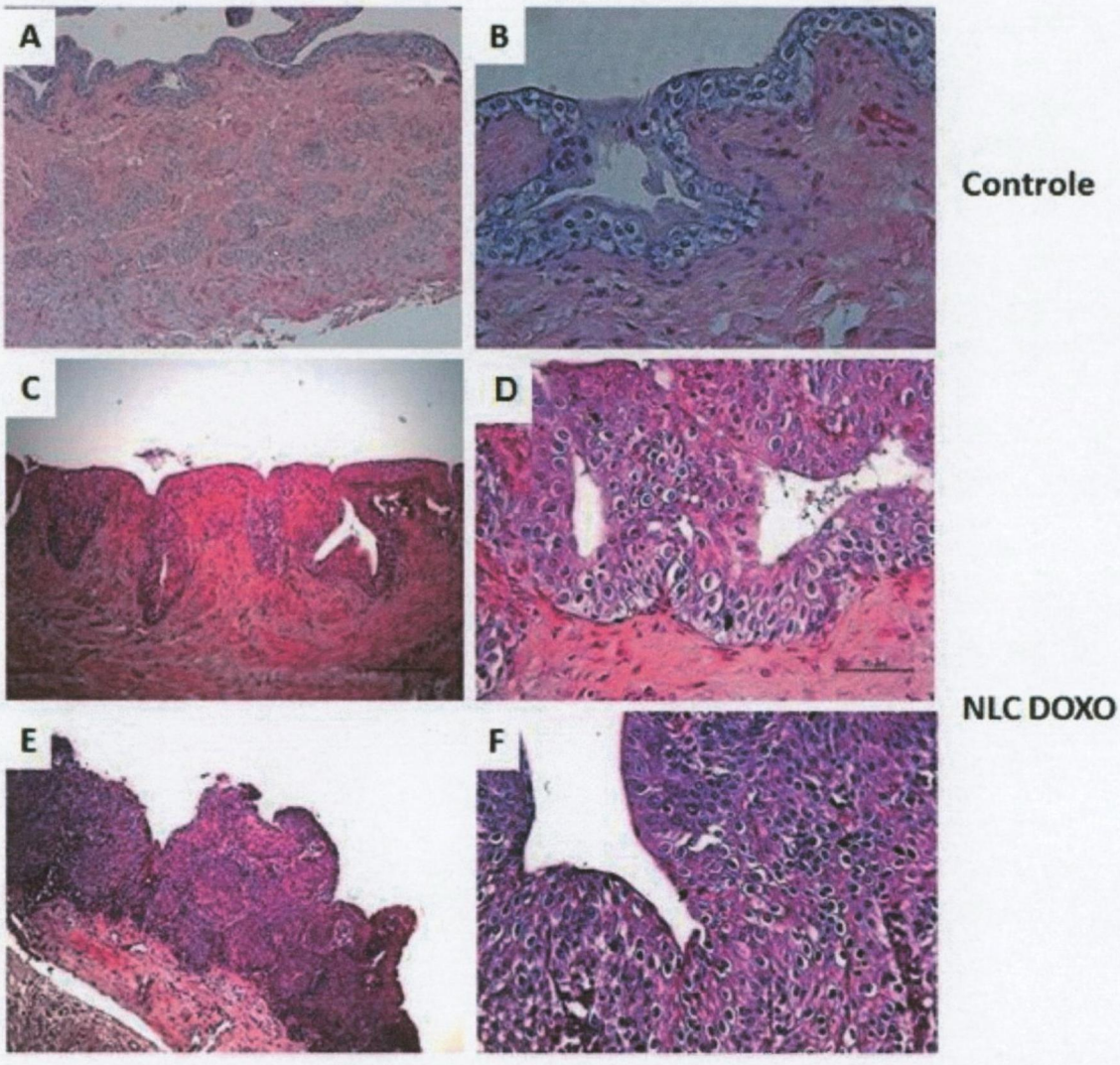


Figura 1

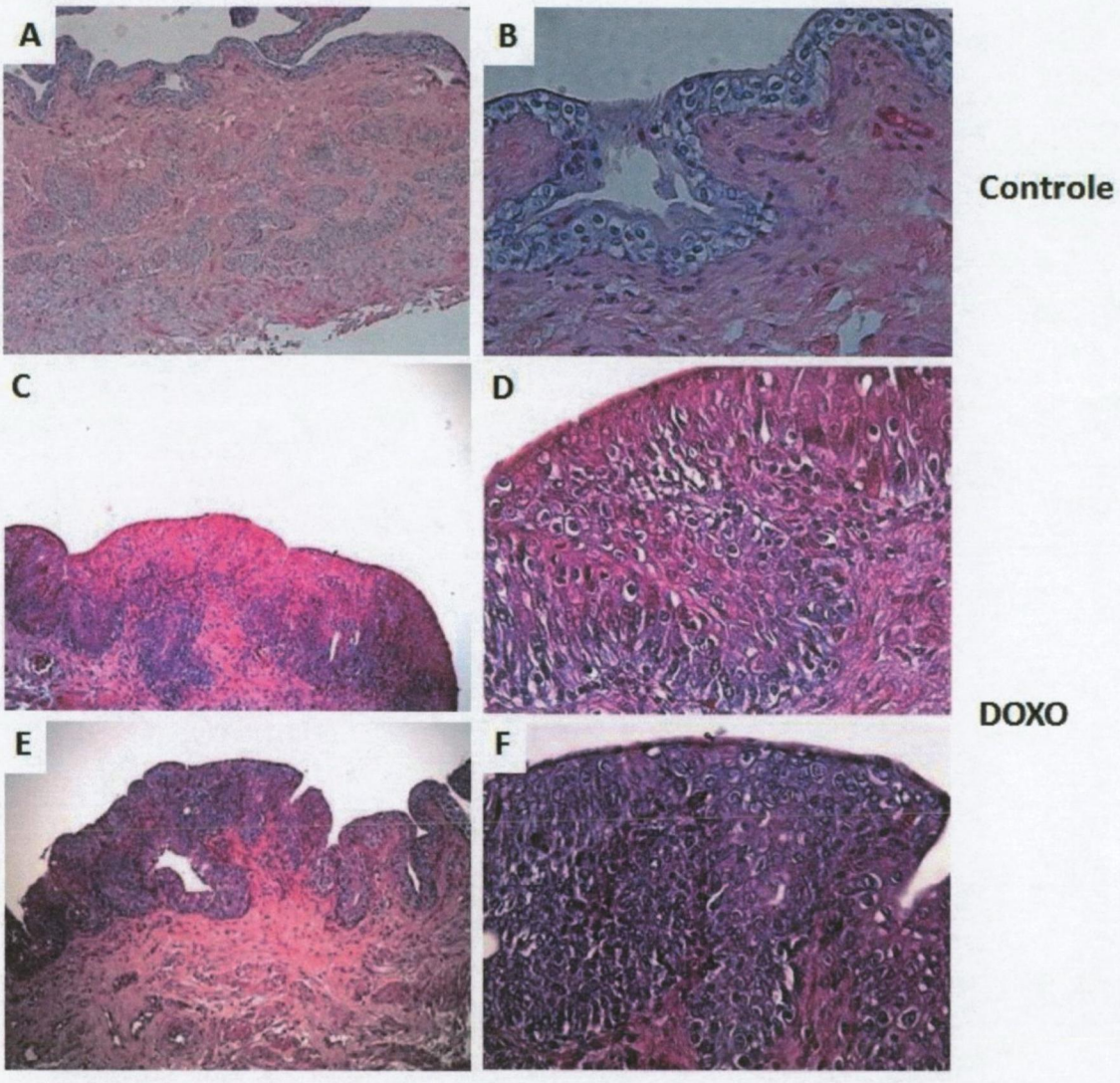


Figura 2

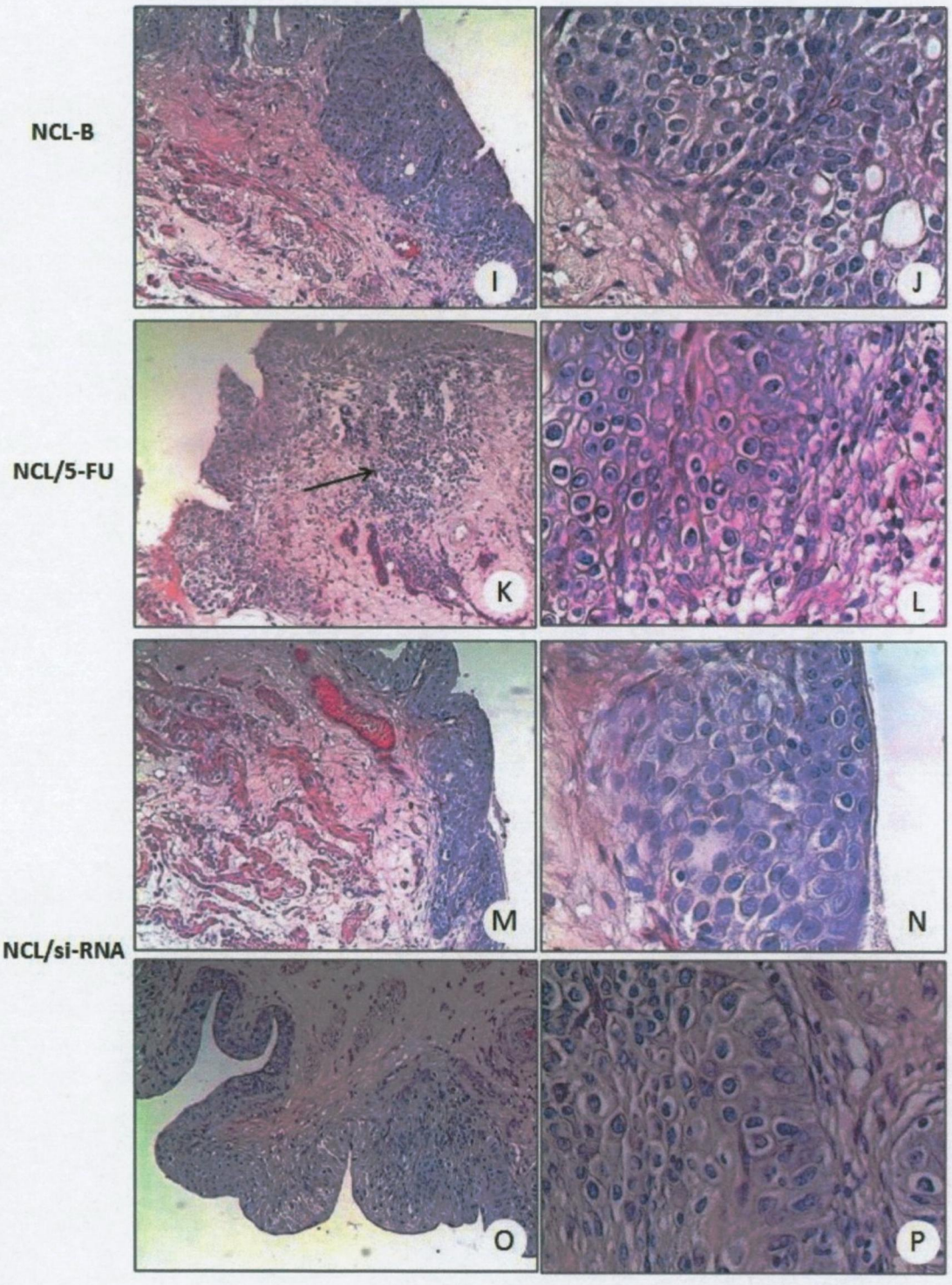


Figura 3

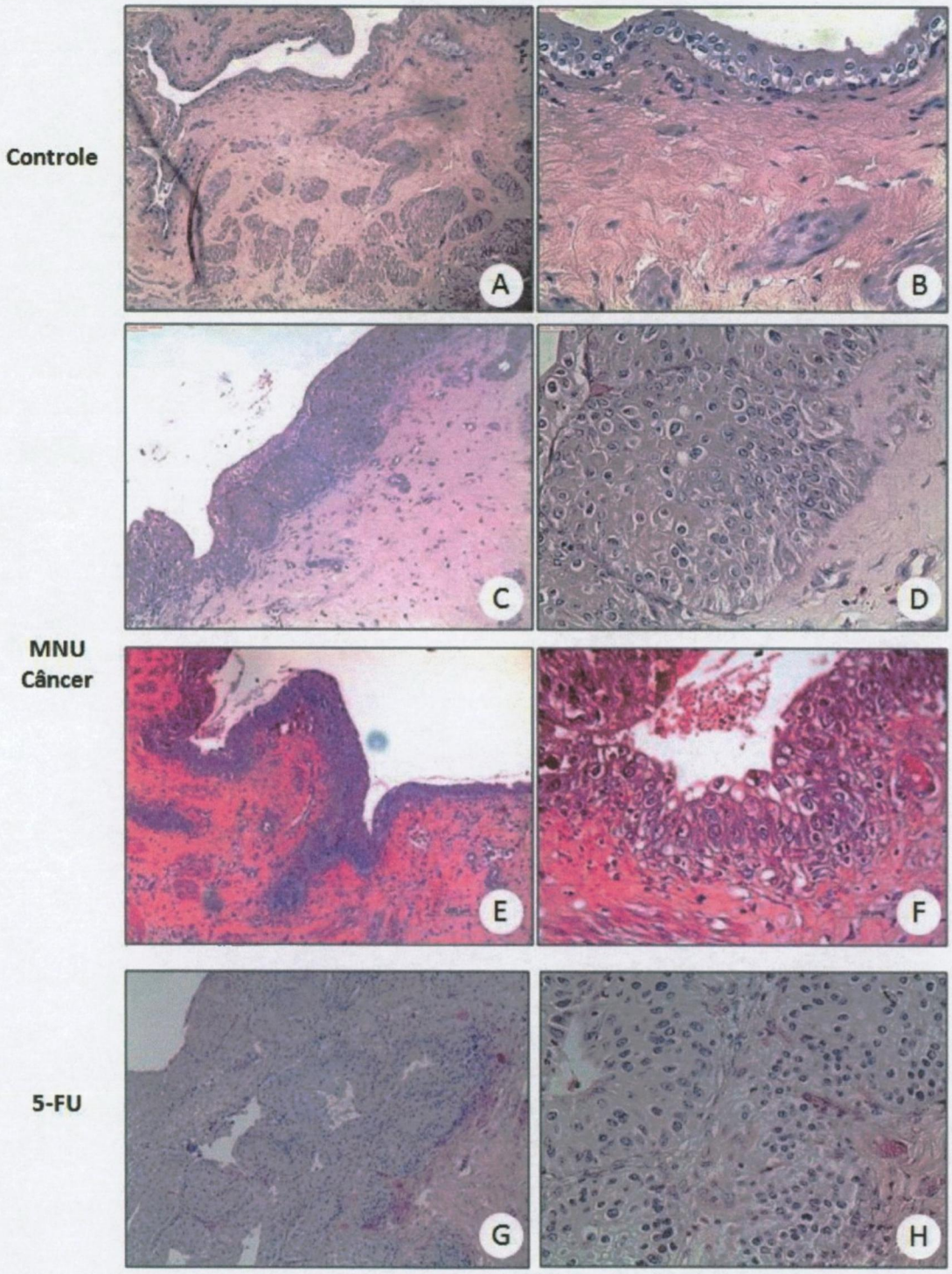


Figura 4