



* B R 1 0 2 0 2 0 0 1 7 8 7 5 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 102020017875-0 B1

(22) Data do Depósito: 01/09/2020

(45) Data de Concessão: 24/12/2024

(54) Título: NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE ALFA-TERPINOL

(51) Int.Cl.: A61K 9/51; A61K 47/58; A61K 31/045; C07C 33/14.

(52) CPC: A61K 9/51; A61K 47/58; A61K 31/045; C07C 33/14.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ.

(72) Inventor(es): ANDERSON NOGUEIRA MENDES; FELIPE ALVES BATISTA; JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES; SABRYNA BRENA CUNHA FONTELE.

(57) Resumo: NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE a-TERPINOL. A presente invenção descreve a formulação de um sistema de liberação de fármaco com atividade antitumoral para câncer de pele (linhagens B16-F10) que, compreende o encapsulamento de a-terpineol, um agente ativo de origem natural, em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, via método de polimerização radicalar em miniemulsão. O nanosistema proposto demonstrou uma diminuição da viabilidade celular na linhagem tumoral e nenhuma ação citotóxica significativa em células normais, além de se mostrar mais potente e eficiente do que a molécula de a-terpineol livre, dessa maneira, viabilizando o emprego do a-terpineol em terapias antitumorais.

NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE α -TERPINOL

BREVE DESCRIÇÃO

[001] Trata a presente solicitação de patente de invenção de um “**NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE α -TERPINOL**”, que se refere à formulação de um sistema de liberação de fármaco obtido a partir do encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, via método de polimerização radicalar em miniemulsão, com capacidade de liberação e/ou entrega do ativo ao um local ou ponto específico do organismo, mantendo, dessa maneira, sua atividade.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence à biotecnologia e farmacêutica, às seções de nanotecnologia e necessidades humanas, ao campo de saúde, mais especificamente, ao de preparações para finalidades médicas; uma vez que se refere a uma formulação de um sistema de liberação de agente ativo, obtido a partir do encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, a ser empregada para liberação de fármaco com atividade antitumoral.

CONVENCIMENTO

[003] O uso de técnicas para produção de estruturas nanométricas para fins biológicos é tão grande, que levou a uma ramificação da medicina, a qual é voltada para esses sistemas, chamada de nanomedicina. Durante o tratamento de diversas doenças, tal como o câncer, a administração de drogas em sua forma livre não consegue alcançar a eficiência ideal, reagindo com outros grupos de células ou tecidos e ainda sendo degradadas antes de chegar ao local desejado, ou seja, o ativo não consegue transpor as barreiras impostas pelo organismo, esse problema tem sido um grande desafio para profissionais ligados à saúde e pesquisadores.

[004] Nesse sentido, as nanopartículas poliméricas são uma promissora alternativa para a síntese de transportadores de fármacos, devido à boa aceitação do organismo a elas (Dhivya *et. al*, 2018: *Enhancing the anti-gastric cancer activity of curcumin with*

biocompatible and pH sensitive PMMA-AA/ZnO nanoparticles). As nanopartículas poliméricas podem ser usadas para encapsular, transportar e entregar agentes terapêuticos, relacionados ao tratamento de câncer (Soni e Yadav, 2015: *Applications of nanoparticles in treatment and diagnosis of leukemia*). No entanto, a síntese de um sistema para liberação de fármaco não é simples e deve considerar critérios como: toxicidade, facilidade de administração, transporte até o alvo e a entrega do agente ativo (Ramezanpour *et al.*, 2016: *Computational and experimental approaches for investigating nanoparticle-based drug delivery systems*).

[005] Nos últimos anos, os compostos naturais e seus derivados sintéticos têm sido cada vez mais investigados com o objetivo de serem empregados em terapias para as células tumorais de maneira mais seletivas, a fim de causar menos agressão ao organismo (Reddy *et al.*, 2003: *Natural products for cancer prevention: a global perspective*).

[006] O α -terpineol é classificado do ponto de vista químico como um álcool volátil monoterpenóide, que facilmente pode ser obtido do óleo essencial de muitas espécies de plantas, uma vez que ele é componente majoritário. Na literatura, são encontradas descrições acerca de suas funções, tais como o aumento da solubilidade de compostos lipossolúveis na pele, efeitos anti-proliferativos sobre células cancerígenas humanas, anti-inflamatórias, atividade antibacteriana, antifúngica e como potente inibidor da produção de superóxidos (Nogueira *et al.*, 2014: *Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1beta, IL-6 and IL-10 on human macrophages*).

[007] Há estudos que descrevem o α -terpineol como um inibidor eficaz do agente de transcrição NF- κ B, um heterodímero de duas subunidades p65 e p50. A ativação desse fator implica na existência de diversos mecanismos regulatórios na célula, por exemplo, ele está relacionado à resposta inflamatória e o desenvolvimento de cânceres. Além disso, o fator é conhecido por atuar na indução de genes relacionados à resposta imune, sobrevivência celular e câncer (Hassan *et al.*, 2016: *Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling*). Nesse sentido, os estudos sugerem que a inibição do fator de transcrição pode atuar no encerramento

do processo de proliferação ou ainda tornar a célula mais sensível a ação de agentes terapêuticos anticâncer.

[008] Apesar de ser um ativo promissor, a alta hidrofobicidade do α -terpineol limita sua aplicação de maneira direta, uma vez que são necessários outros agentes químicos para que sua dissolução em meio aquoso seja possível. Assim, sua disponibilização em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, conforme descrito na presente invenção, viabiliza seu emprego em terapias antitumorais.

[009] O polimetacrilato de metila (PMMA) é constantemente descrito na literatura como um material seguro para aplicações médicas, ou seja, ele é biocompatível. Entretanto, esse polímero é não biodegradável, característica que pode fazê-lo um promissor dispositivo para entrega de droga e liberação de drogas, pois dessa forma ele pode se manter por um período maior na corrente sanguínea e propiciar uma concentração de fármacos em níveis terapêuticos. Além disso, apesar de ser um polímero facilmente sintetizado por meio de diversas técnicas de polimerização, a metodologia empregada na presente invenção foi a técnica de miniemulsão, porque ela é conhecida pela capacidade de produzir nanoestruturas e simultaneamente encapsular compostos de natureza hidrofílica ou hidrofóbica perfeitamente.

[010] Nesse contexto, é vislumbrado um nanosistema para liberação de fármaco de α -terpinol, baseado em polimetacrilato de metila, o qual é obtido a partir do encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, via método de polimerização radicalar em miniemulsão, com o objetivo de disponibilizar um transportador/protetor de fármaco, para a administração da molécula de α -terpineol sobre modelos de câncer de pele (linhagem B16-F10).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[011] O α -terpineol é um composto amplamente descrito na literatura e bastante comum em óleos essenciais, sendo um componente comum em diferentes produtos cosméticos (KHALEEL *et al.*, 2018: *α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties*), sua ampla utilização e importância industrial incentiva diversas pesquisas sobre suas propriedades toxicológicas a nível celular.

[012] Estudos prévios com o α -terpineol demonstraram sua atividade antitumoral contra linhagens cancerígenas de carcinoma de pulmão de pequenas células (NCI-H69), mama (MCF-7), colorretal (HCT-8, SW620, HCT-116 e HT-29), leucemia mielóide crônica (K-562), além de suprimir a expressão de NF- κ B, o qual está associado à inibição do crescimento de células tumorais. Além disso, sua atividade citotóxica efetiva é promissora para o tratamento de pacientes com tumores resistentes a drogas ou tumores sólidos devido aos efeitos limitados de resistência ao alfa-terpineol (HASSAN *et al.*, 2010: *Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling*).

[013] Negreiros (2019), em sua dissertação, intitulada "Perfil toxicogenético e antitumoral do alfa-terpineol em testes não clínicos", avaliou os efeitos toxicogenéticos e a atividade antitumoral do α -terpineol em células tumorais murinas (B16-F10 e Sarcoma 180) bem como em células não tumorais (macrófagos murinos, linfócitos e fibroblastos humanos, hemácias e *em Allium cepa*), a partir da aplicação de biomarcadores citogenéticos e de morte celular. O estudo propôs que os efeitos antitumorais do α -terpineol podem ser explicados pela associação dos mecanismos citogenéticos à perda da integridade da membrana plasmática causada pela exposição ao composto e pela perda da fosfatidilserina, sendo, dessa maneira, o α -terpineol um monoterpeno candidato a formulações farmacêuticas antitumorais.

[014] No atual estado da técnica, além de diversos estudos que se referem a atividade antitumoral de α -terpineol, estão presentes algumas anterioridades patentárias que descrevem o emprego do composto em composições farmacêuticas para diferentes terapias. No entanto, nenhuma das anterioridades, seja científica ou patentária, descreve a viabilização do emprego do α -terpineol, por meio da disponibilização da formulação de um nanossistema de liberação, obtido a partir do encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, via método de polimerização radicalar em miniemulsão.

[015] A anterioridade BR102017008579-1, intitulada "Complexo de inclusão α -terpineol em β -ciclodextrina, método de obtenção dos mesmos e seu uso para o tratamento da dor", descreve o emprego de complexos α -terpineol/ β -ciclodextrina no tratamento de

dor, melhorando a atividade antinociceptiva do monoterpeneo frente à dor crônica. Para tanto o complexo α -terpineol/ β -ciclodextrina é obtido a partir do método de co- evaporação, o qual favorece a síntese, proporcionando melhorias na estabilidade, solubilidade e efeito farmacológico do complexo. Ainda que a anterioridade descreva a obtenção de um complexo eficiente para o tratamento de dores crônicas, é empregada uma metodologia de síntese diferente da presente invenção, a qual pleiteia o encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, via método de polimerização radicalar em miniemulsão. Além disso, a presente invenção não emprega β -ciclodextrina, e o nanosistema não é empregado no tratamento de dores crônicas, mas sim devido em terapias antitumorais.

[016] A anterioridade WO2017146414, intitulada "*Composition for skin moisturization and skin wrinkle alleviation, containing α -terpineol as active ingredient*", descreve composições dermocosméticas e alimentícias que contém α -terpineol como ativo. As composições propostas têm efeitos de aumentar a quantidade de secreção de procolágeno, inibir o eritema, promover a biossíntese de colágeno, reduzir a expressão do gene MMP-1 e inibir a hiperplasia da camada epidérmica da pele, causando efeitos de hidratação, alívio das rugas, melhora da elasticidade da pele e inibição do eritema. No entanto, a anterioridade não menciona ou propõe o emprego do ativo imobilizado em nanocápsulas de polimetacrilato de metila.

[017] Também está presente no atual estado da técnica a anterioridade PI0605089-1, intitulada "Processo de preparação de 1,4 e 1,8-cineóis através da isomerização do (alfa)-terpineol catalisada por heteropoliácido", que descreve a síntese de éteres monoterpênicos a partir de α -terpineol, para aplicação em produtos alimentícios, indústria farmacêutica e como herbicidas, no entanto, sem mencionar processo de encapsulamento.

[018] A anterioridade BR112014013614-9, intitulada "Composição antimicrobiana de fenóis monossubstituídos e terpineol, método não-terapêutico de desinfecção de uma superfície e uso não-terapêutico de uma composição de fenóis monossubstituídos e terpineol", refere-se a composições antimicrobianas que compreendem fenóis monossubstituídos selecionados e terpineol para limpeza pessoal, higiene oral ou

aplicações de limpeza de superfícies duras, devido a sua ação antimicrobiana rápida, inativação microbiana após um tempo de contato de apenas 15 segundos. Apesar de a anterioridade não ser considerada próxima a presente invenção, ela é apresentada para ilustrar outros usos do α -terpineol.

[019] Assim, observa-se que, ainda que sejam conhecidas diversas aplicações e a atividade antitumoral de α -terpineol a presente invenção apresenta como principal contribuição técnica a viabilização da disponibilização do ativo ao alvo, por meio de um sistema compreendido pelo encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, via método de polimerização radicalar em miniemulsão, dessa maneira, preservando sua atividade até o local de interesse.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[020] A presente invenção tem como objetivo viabilizar a disponibilização do α -terpineol ao local de interesse, para terapias antitumorais para câncer de pele, por meio de um nanosistema de liberação do fármaco compreendido pelo encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila.

DA INVENÇÃO

[021] A presente invenção descreve a formulação de um nanosistema de liberação de fármaco com atividade antitumoral para câncer de pele (linhagens B16-F10) que compreende o encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila, via método de polimerização radicalar em miniemulsão.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[020] A presente invenção apresenta como principais vantagens:

- ✓ Disponibilização de uma formulação de nanosistema de liberação de fármaco com atividade antitumoral que viabiliza a disponibilização do α -terpineol ao local de interesse, preservando sua atividade até atingir o alvo;
- ✓ Disponibilização de um sistema de liberação do fármaco compreendido pelo encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila que, possibilita a diminuição da viabilidade celular na linhagem tumoral (linhagem B16-F10, câncer de pele);

- ✓ Disponibilização de um sistema de liberação do fármaco compreendido pelo encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila que, não possui nenhuma ação citotóxica significativa em células normais;
- ✓ Disponibilização de um sistema de liberação do fármaco compreendido pelo encapsulamento de α -terpineol em nanocápsulas de polimetacrilato de metila que, mostra-se mais potente que a molécula de α -terpineol livre.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[021] A invenção será descrita em uma realização preferencial, assim, para melhor entendimento, serão feitas referências às figuras relacionadas:

- ✓ FIG 1: Imagem de microscopia eletrônica dos nanosistemas, obtidos pelo processo de polimerização em miniemulsão;
- ✓ FIG 2: Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) elucidando as absorções típicas de grupos funcionais das amostras de PMMA (A) e PMMA/ α -terpineol (B);
- ✓ FIG 3: Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons (H^1 RMN) para a molécula de α -terpineol livre (a), PMMA (b) e α -terpineol/PMMA (C);
- ✓ FIG 4: Efeitos do α -terpineol/PMMA nas células normais: hemólise (A), viabilidade de macrófagos murinos (B) e viabilidade de fibroblastos humanos MRC-5 (C). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT após 48 h de incubação com α -terpineol/PMMA (5–500 μ g/mL). PMMA sozinho (veículo) e doxorrubicina 50 μ g/mL (DOXO) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são apresentados como média \pm SEM, obtidos de três experiências independentes (n=3) em triplicado. ANOVA: teste de Dunnet, *p<0,05;
- ✓ FIG 5: Efeitos de α -terpineol/PMMA em linhas celulares de melanoma de camundongos B16-F10 (A) e humano SK-MEL-28 (B). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT após 48 h de incubação com α -terpineol/PMMA (5–500 μ g/mL). PMMA sozinho (veículo) e doxorrubicina 50 μ g/mL (DOXO) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são

apresentados como média \pm SEM, obtidos de três experiências independentes (n=3) em triplicado. ANOVA: teste de Dunnet, *p<0,05; **p<0,01.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[022] O nanossistema de liberação do fármaco é compreendido pelas nanopartículas formadas a partir de nanogotas de monômero (MMA) e α -terpineol, onde cada gota se comporta como um nanoreator durante o processo de polimerização, portanto, o encapsulamento do fármaco e a estruturação do polímero são processos realizados simultaneamente, conforme detalhado a seguir.

[023] As nanopartículas de poli (metacrilato de metila) (PMMA) foram sintetizadas utilizando a técnica de miniemulsão e o método de polimerização por radical, conforme descrito no trabalho de Landfester e de Mendes (Landfester *et al.*, 2013: *Nanocapsules with specific targeting and release properties using miniemulsion polymerization*; Mendes *et al.*, 2017: *Encapsulation of Piper cabralanum (Piperaceae) nonpolar extract in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells*). Para tanto, duas fases, orgânica (I) e aquosa (II), foram preparadas. A Fase I foi preparada misturando-se 15,3 g de MMA e 0,47 g de hexadecano, que foi então mantida sob agitação magnética constante por 4 minutos, à temperatura ambiente (T = 25°C). A Fase II foi obtida misturando-se 0,79g de lauril sulfato de sódio, 0,11g de bicarbonato de sódio e 63,1g de água deionizada, que foi mantida sob agitação à temperatura ambiente (T = 25°C), por 4 minutos. Em seguida, as Fases I e II foram misturadas e agitadas novamente pelo mesmo período. A macroemulsão resultante foi sonicada em amplitude de 40%, por 4 minutos no aparelho Sonifier Branson Digital com agitação e banho de gelo. Por fim, a miniemulsão originada do processo foi inserida em um reator controlado, modelo Easy Max 102-Mettler Toledo, a 80°C, 250 rpm de agitação e duração de 3h de reação. Para o encapsulamento de α -terpineol nas nanopartículas de PMMA, o procedimento de síntese das nanopartículas foi repetido, porém, na Fase I, foram adicionados 20, 160, 200 e 400 mg de α -terpineol, formando o PMMA contendo 20 mg de α -terpineol (PMMA-20), PMMA contendo 160 mg de α -terpineol (PMMA-160), PMMA contendo 200

mg de α -terpineol (PMMA-200) e PMMA contendo 400 mg de α -terpineol (PMMA-400), respectivamente.

[024] Assim, o nanosistema (Fig. 1) à base de polimetacrilato de metila para liberação de α -terpinol se constitui das nanocápsulas de poli(metacrilato de metila), e de α -terpineol, presente no sistema com valores de massa entre 20 e 400mg. Sendo que as nanocápsulas são previamente preparadas, conforme anteriormente descrito e constituídas de: metacrilato de metila, numa proporção de 19% da massa total; hexadecano, numa proporção de 0,5% da massa total; lauril sulfato de sódio, numa proporção de 0,1% da massa total, e; água deionizada, numa proporção de 79% da massa total.

[025] A síntese do polímero foi confirmada por FT-IR, uma vez que absorções características dos componentes da macromolécula foram identificadas (Fig. 2). A banda localizada em 1733 cm^{-1} é proveniente da carbonila (C=O) do grupo éster do polímero, outros sinais corroboram essa afirmação e estão localizados em 1485 cm^{-1} e 1154 cm^{-1} , atribuídos ao dobramento da ligação C-H e estiramento de C-O, respectivamente. Além disso, entre a região de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ encontram-se bandas de estiramento da ligação C-H relacionadas aos grupos CH_2 e CH_3 . A cadeia de grande extensão do polímero é confirmada pela absorção em 750 cm^{-1} , que é proveniente do movimento denominado *rocking* originado pela ligação de três ou mais grupos CH_2 ligados em série.

[026] A análise de RMN de H^1 foi realizada com o objetivo de identificar os hidrogênios em diferentes ambientes químicos presentes nas estruturas do PMMA, α -terpineol e PMMA/ α -terpineol, assim corroborando tanto com a obtenção do polímero quanto mostrando que o encapsulamento foi alcançado com êxito. A figura 3 (A) exibe o espectro de hidrogênio para a amostra de PMMA, no qual é possível observar a presença de três hidrogênios distintos (H_a , H_b e H_c). O sinal forte e mais deslocado do espectro está localizado em 3,37 ppm e é atribuído aos hidrogênios da metila (H_c) diretamente ligada ao grupamento éster. Em 1,56 ppm é identificado o deslocamento químico relativo a H_b , associado ao metileno (CH_2). H_a originam sinais em baixo deslocamento localizados em 0,81 e 1,20 aproximadamente, relacionados à metila

ligada ao carbono α (α -CH₃), todos os sinais são típicos do PMMA. Observando o ambiente químico de cada hidrogênio na estrutura da molécula de α -terpineol é possível determinar a presença de sete tipos de hidrogênio não equivalentes (Ha, Hb, Hc, Hd, He, Hf e Hg), essa análise preliminar é confirmada com a obtenção do espectro da figura 3 (B), pois sete sinais são registrados no mesmo. Ao comparar o espectro de H¹ RMN da amostra de α -terpineol e PMMA/ α -terpineol (Fig. 3C), observa-se que para a última amostra não são identificados os sinais referentes a molécula de α -terpineol, fato que indica que esta foi encapsulada na matriz polimérica de PMMA.

[027] A seguir, são descritos os testes de toxicologia e os que demonstram o efeito das nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol contra células de melanoma.

[028] Perfil toxicológico de nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol.

[029] Por meio do método BSLB, foram avaliados o perfil toxicológico do α -terpineol puro, bem como seu produto nanocapsulado (α -terpineol / PMMA). A tabela 1 mostra os valores de LC₅₀ obtidos quando esses compostos foram incubados em *A. salina* por 24 e 48h. O KDCr foi usado como controle positivo e nenhuma mortalidade significativa foi observada quando a solução salina e o PMMA isoladamente (veículo) foram incubados ao longo dos nauplii nas mesmas condições descritas na tabela 2.

ADME – α -terpineol	
BBB - <i>in vivo</i> penetração da barreira hematoencefálica (C.brain/C.blood)	511.925
Solubilidade do tampão (mg/L)	322.76
Caco2 (nm/sec.)	508.083
CYP_2C19_ inibição	Inibido
CYP_2C9_ inibição	Inibido
CYP_2D6_ inibição	Não
CYP_2D6_ substrato	Não
CYP_3A4_ inibição	Não
CYP_3A4_ substrato	Fraco
Absorção intestinal humana - HIA (%)	100
MDCK (mandin darby rim canino) - <i>in vitro</i> permeabilidade celular	191.284

Pgp_inibição	Não
Ligação às proteínas plasmáticas (%)	23.416.307
Solubilidade em água pura (mg/L)	3996.87
Permeabilidade da pele	-1.15733
SKlogD_valor	2.198.800
SKlogP_valor	2.198.800
SKlogS_tampão	-2.679350
SKlogS_puro	-1.586510
algae_at (mg/L)	0.03243
Ames_teste	Mutagênese
Carcino_mouse	Negativo
Carcino_rat	Negativo
Daphnia_at (mg/L)	0.465244
hERG_inibição	Risco baixo
medaka_at (mg/L)	0.225615
minnow_at (mg/L)	0.175275
TA100_10RLI	Negativo
TA100_NA	Negativo
TA1535_10RLI	Positivo
TA1535_NA	Negativo

Tabela 1: Propriedades PreADME e previsões de toxicidade do α -terpineol.

Droga	LC ₅₀ (μ /mL)	
	24h	48h
α -Tp	76.4 \pm 4.5	68.3 \pm 8.6
α -Tp/PMMA	698.8 \pm 74.6	481.7 \pm 82.3
KDCr	16.0 \pm 1.0	15.6 \pm 0.6

Tabela 2: Avaliação da toxicidade de α -terpineol puro (α -Tp) e nanocapsulado (α -Tp/PMMA) em *Artemia salina* após 24 e 48 h de exposição.

[030] Os valores são representados como média \pm DP. O KDCr (dicromato de potássio) foi usado como controle positivo. Cada concentração foi testada usando três tubos (10 nauplii / tubo); CL₅₀: concentração letal de 50%. Estudos de letalidade em *A. salina* podem ser usados como um bioensaio preliminar, rápido e simples para testar extratos de plantas e compostos orgânicos que, na maioria dos casos, se correlacionam razoavelmente bem com as propriedades citotóxicas e antitumorais (Ozcelik *et al.*, 2011: *Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids*). Alguns estudos recentes usando o método BSLB relataram a toxicidade de plantas enriquecidas pelo monoterpeneo α -terpineol como seu constituinte principal (Abdul Hammid e Ahmad, 2015: *Chemotype of Litsea cubeba essential oil and its bioactivity*; Satyal *et al.*, 2013: *Volatile constituents of Pinus roxburghii from Nepal*). Estudos em modelos animais também demonstraram a toxicidade aguda do α -terpineol quando administrados em doses baixas (LD₅₀ de 0,847 g/kg) (Bhatia *et al.*, 2008: *Fragrance material review on alpha- terpineol*). Os dados obtidos com o nanosistema demonstraram que o α -terpineol/PMMA foi capaz de reduzir fortemente a toxicidade deste monoterpeneo, observada por um aumento do LC₅₀ (Tabela 2).

[031] A atividade hemolítica do α -terpineol/PMMA foi avaliada em concentrações variando de 5 a 500 μ g/mL. Pelos dados obtidos, não foi observado efeito hemolítico (% hemólise) mesmo quando testadas altas concentrações (Fig. 4). O ensaio hemolítico avalia a estabilidade mecânica da membrana eritrocitária, bem como indica danos causados por vários compostos, como triagem de citotoxicidade (Mendes *et al.*, 2017: *Encapsulation of Piper cabralanum (Piperaceae) nonpolar extract in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells*; Sharma e Sharma, 2001: *In vitro hemolysis of human erythrocytes - by plant extracts with antiplasmodial activity*).

[032] A viabilidade das células normais foi avaliada a fim de se investigar se α -terpineol/PMMA poderia induzir qualquer toxicidade contra humanos ou camundongos. Pelo teste de MTT, observou-se que nenhuma alteração significativa na viabilidade celular foi detectada quando α -terpineol/PMMA foi incubado (5-500 μ g/mL) em macrófagos de camundongos normais, nem linha celular de fibroblastos humanos

(MRC-5) (Fig. 5B, C). Como esperado, a doxorubicina de controle positivo (50 µg/mL) reduziu a viabilidade celular das células MRC-5 de $101,0 \pm 8,9\%$ (controle) para $64 \pm 1,7\%$ ($p < 0,05$).

[033] Ensaio de citotoxicidade foram realizados pelo método MTT para avaliar o potencial citotóxico de nanopartículas de α -terpineol contra linhagens de células de melanoma como B16-F10 (murino) e SK-MEL-28 (humano) (Fig. 5). Os dados mostraram que a citotoxicidade induzida por α -terpineol/PMMA em B16-F10 reduziu a viabilidade celular de $99,6 \pm 5,1\%$ (controle) para $58,6 \pm 9,3\%$ ($p < 0,05$), $45,6 \pm 15,9\%$ ($p < 0,05$) e $43,8 \pm 1,8\%$ ($p < 0,01$), quando incubado a 5, 50 e 500 µg/mL, respectivamente (Fig. 5A). Resultado semelhante foi observado com células de melanoma humano, quando a viabilidade celular diminuiu de $99,7 \pm 14,5\%$ (controle) para $56,0 \pm 12,3\%$ ($p > 0,05$), $45,8 \pm 12,9\%$ ($p < 0,05$) e $40,8 \pm 7,7\%$ ($p < 0,05$), quando incubado com α -terpineol/PMMA nas mesmas condições (Fig. 5B). Como esperado, o controle positivo doxorrubicina (50 µg/mL) produziu alta mortalidade nessas linhas de células (70-80%), mas não o PMMA sozinho ($p > 0,05$) (Fig. 5A, B).

[034] O método MTT fornece uma indicação da atividade mitocondrial e integridade metabólica celular, pela capacidade das células ativas metabólicas e saudáveis de converter o tetrazólio (MTT) em um produto formazan de cor roxa, alterando sua absorvância (Mosmann, 1983: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*; Couliadiati et al., 2016: *Antitumoral activity of novel 1,4-naphthoquinone derivative involves L-type calcium channel activation in human colorectal cancer cell line*). Por esse método, foi demonstrada a baixa toxicidade das nanopartículas de α -terpineol/PMMA em células animais normais. Esses dados corroboram com experimentos anteriores, como o BSLB e a atividade de hemólise realizados, sugerindo relativa segurança farmacológica do α -terpineol/PMMA.

[035] Efeito de nanopartículas de PMMA contendo α -terpineol contra células de melanoma.

[036] Vários estudos demonstraram as propriedades anticâncer de óleos essenciais ricos em α -terpineol de plantas aromáticas contra diferentes linhas de células tumorais, como HTC116 (adenocarcinoma de cólon), carcinoma de pulmão (A549), glioma de

rato (C-6), câncer de próstata (LNCaP , PC-3) e glioblastoma (SF-763, SF-767) (Kumar *et al.*, 2015; Bayala *et al.*, 2014; Itani *et al.*, 2008). De fato, o mecanismo antitumoral do α -terpineol foi sugerido envolvendo a inibição da via NF-kB relacionada ao bloqueio de JNK1, JAK3, AKT e IKKbeta-quinases. Um estudo recente realizado por Chao *et al.* (2017) mostrou que o α -terpineol possuía potentes atividades antitirozinase e antimelanogênica quando incubado em células de melanoma B16, esses relatos corroboram com os achados de citotoxicidade do α -terpineol/PMMA contra linhagens celulares de melanoma (B16-F10 e SK-MEL-28), sugerindo o potencial dessas nanopartículas para o tratamento do melanoma.

[037] Assim, a presente invenção demonstra a versatilidade do polímero PMMA para a produção de nanopartículas poliméricas, com capacidade de incorporar óleos essenciais e medicamentos que apresentam grande dificuldade de solubilização em meios aquosos. O processo de síntese do PMMA com α -terpineol permitiu a produção de nanopartículas de PMMA com até 400 mg de α -terpineol. Os resultados obtidos sugerem que o α -terpineol aumentou a eficácia antitumoral quando incorporado no sistema PMMA/ α -terpineol. Comparado ao monoterpeno em sua forma livre, o efeito citotóxico foi aprimorado quando testado em linhas de tumor derivadas de melanoma. Ao mesmo tempo, não foi identificada toxicidade em células normais como macrófagos humanos e fibroblastos humanos MRC-5, o que mostra importância no aspecto de biodisponibilidade do nanossistema, o que demonstra a contribuição técnica da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. **NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE α -TERPINOL** caracterizado por se constituir de:
 - ✓ nanocápsulas de poli(metacrilato de metila), e;
 - ✓ α -terpineol, presente no sistema com valores de massa entre 20 e 400mg.
2. **NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE α -TERPINOL**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** nanocápsulas de poli(metacrilato de metila) se constituírem de:
 - ✓ metacrilato de metila, numa proporção de 19% da massa total;
 - ✓ hexadecano, numa proporção de 0,5% da massa total;
 - ✓ lauril sulfato de sódio, numa proporção de 0,1% da massa total, e;
 - ✓ água deionizada, numa proporção de 79% da massa total.
3. **NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE α -TERPINOL**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** α -terpineol, de origem natural, estar presente, preferencialmente, em valores de massa de 20, 160, 200 ou 400 mg.
4. **NANOSISTEMA À BASE DE POLIMETACRILATO DE METILA PARA LIBERAÇÃO DE α -TERPINOL**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser empregado como transportador do agente ativo α -terpinol no tratamento de câncer de pele (linhagens B16-F10).

FIG. 1

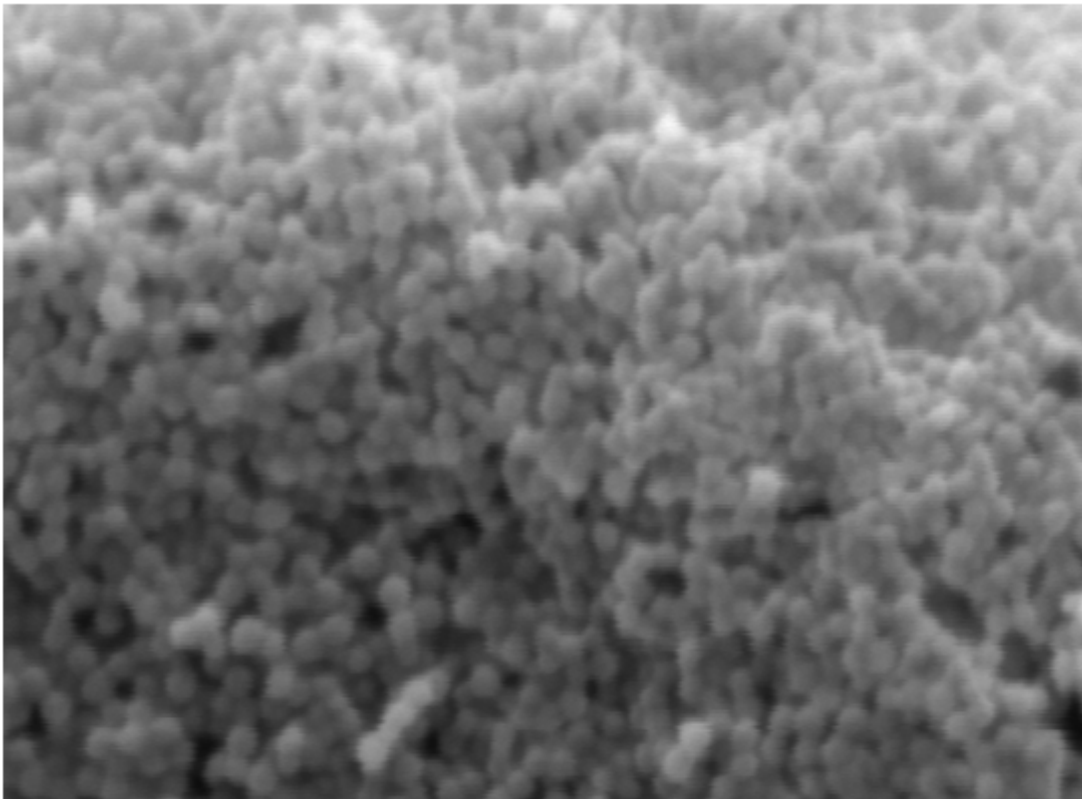


FIG. 2

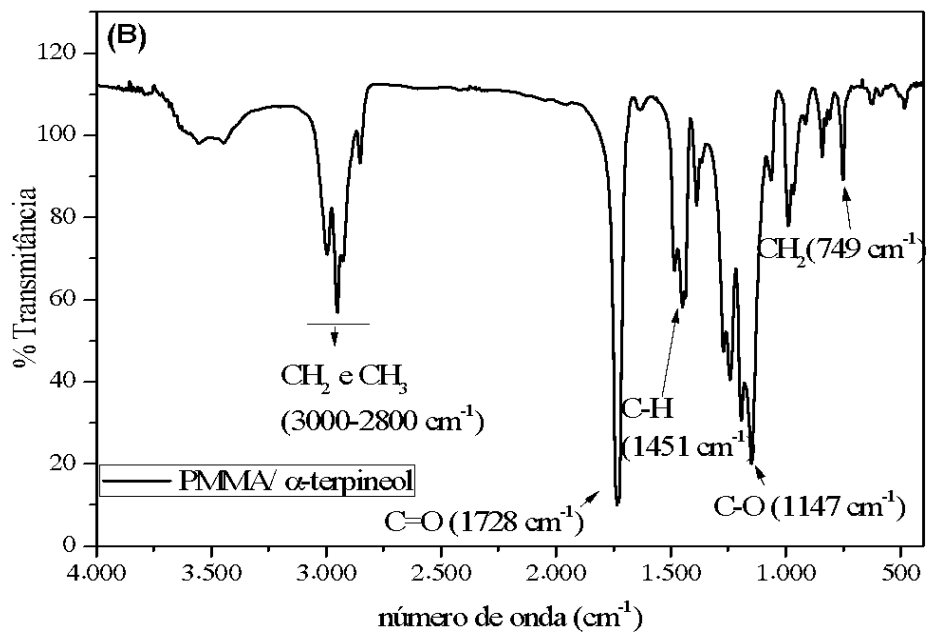
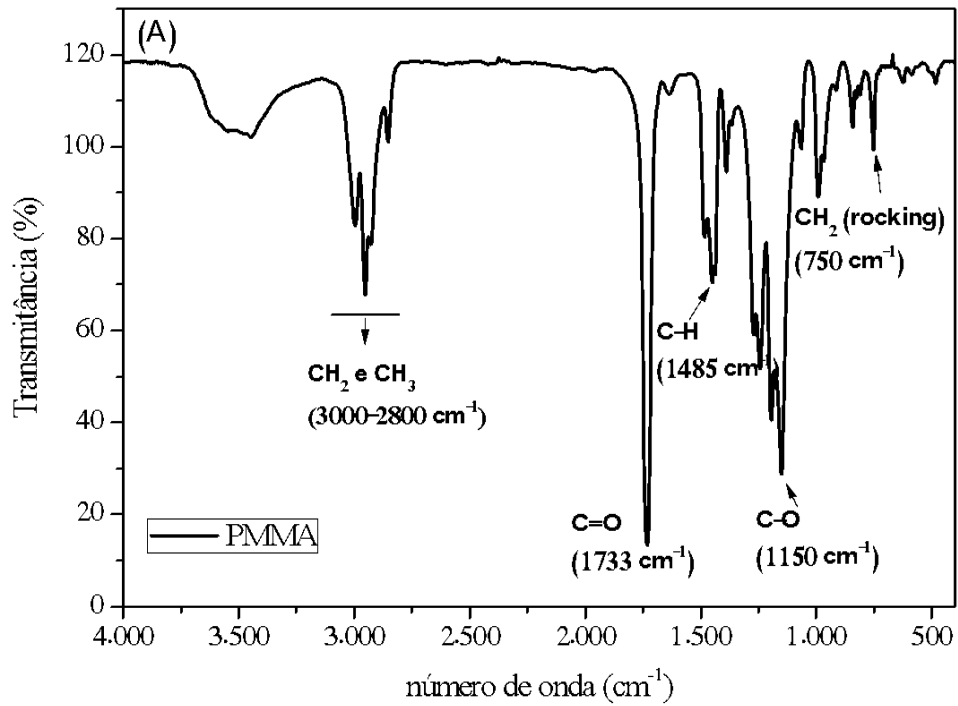


FIG. 3

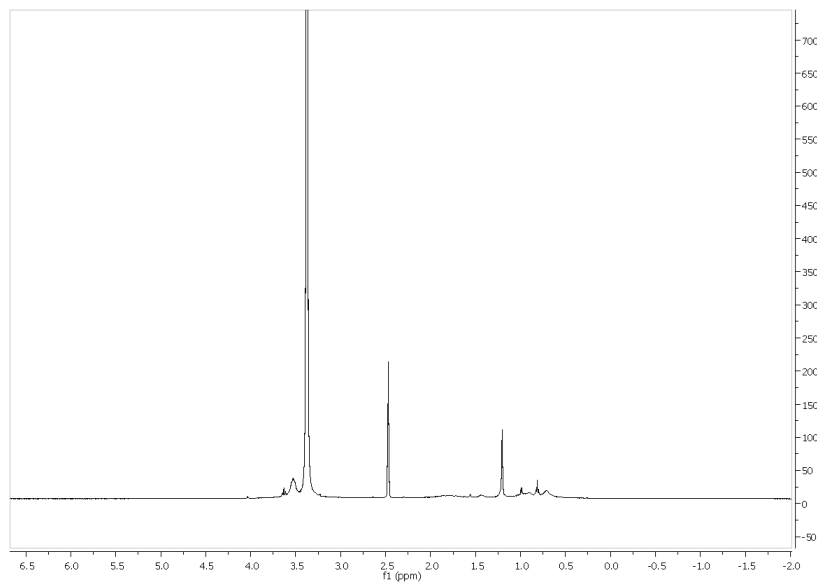
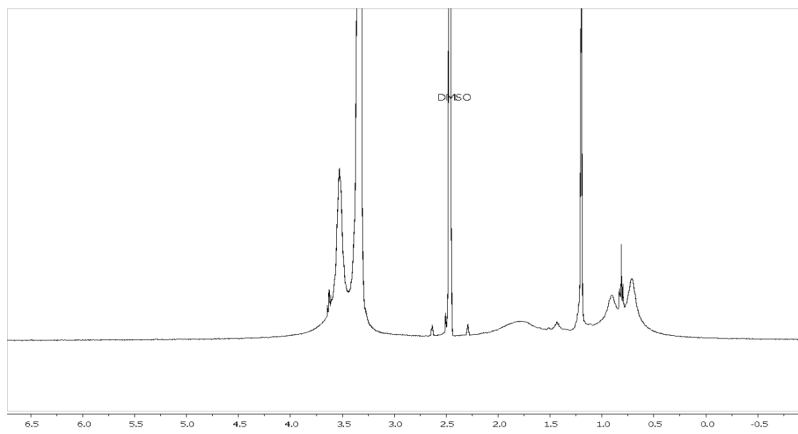
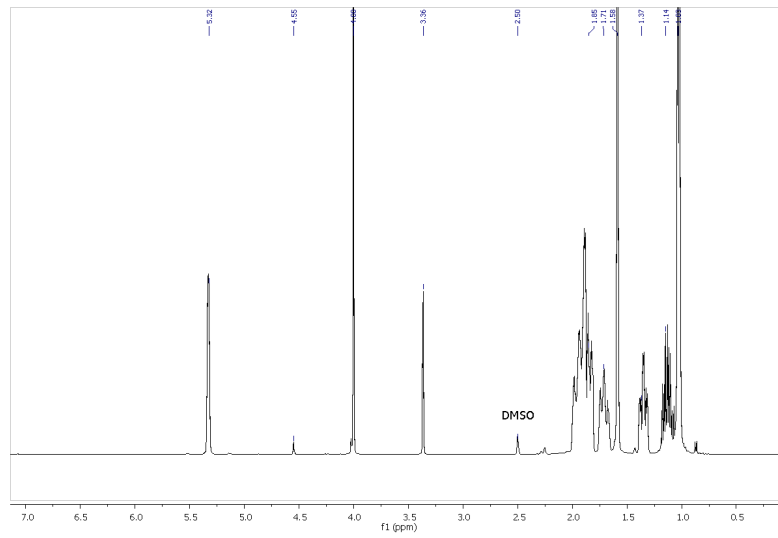


FIG. 4

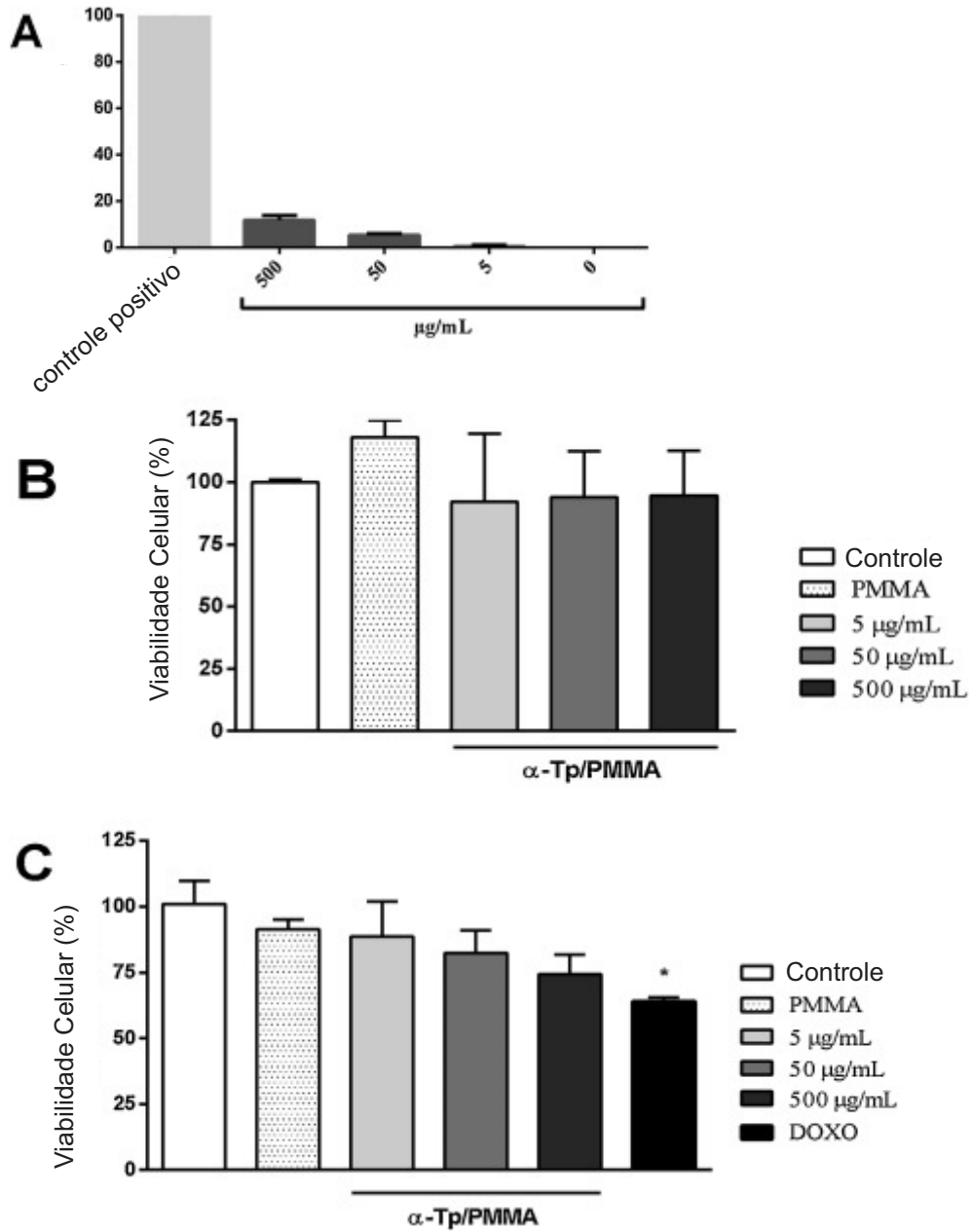


FIG. 5

