



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

(21) BR 10 2013 002259-4 A2



(22) Data de Depósito: 30/01/2013
(43) Data da Publicação: 09/09/2014
(RPI 2279)

(51) Int.Cl.:

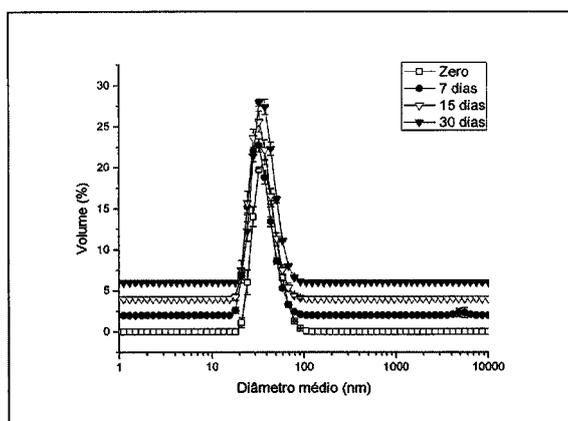
A61K 9/107
A61K 47/10
A61K 47/34
A61K 47/30
A61K 47/44
A61K 31/00

(54) Título: NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio de Janeiro Ufrj

(72) Inventor(es): Claudia Regina Elias Mansur, Eduardo Ricci Júnior, Juliana Perdiz Senna, Vânia Emerich Bucco de Campos

(57) Resumo: NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO. A presente invenção descreve uma nanoemulsão óleo em água consistida de entre 5 a 40% massa/massa (m/m) de ao menos um tensoativo, entre 1 a 50% m/m de ao menos um óleo; e, opcionalmente, aproximadamente 30% um ou mais solventes; seu processo de produção e ainda, seu uso na veiculação de compostos hidrofóbicos, podendo ser fármaco, cosmético, vitamina ou um composto alimentar



NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO
CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo da nanotecnologia, especificamente ao campo da fabricação ou tratamento de nanoestruturas, mais especificamente ao campo das nanoestruturas para liberação de compostos hidrofóbicos.

ESTADO DA TÉCNICA

A nanotecnologia tem experimentando um rápido crescimento, com diversas aplicações inovadoras na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, química, de ciência de materiais e poliméricas. Na área farmacêutica, os sistemas nanoestruturados como nanopartículas, lipossomos, nanoemulsão e dendrímeros têm se destacado nas últimas décadas como sistemas carreadores de compostos hidrofóbicos.

Para estes compostos, a pobre solubilidade em água é o fator limitante para o uso destes em diferentes aplicações no campo da indústria farmacêutica, cosmética e alimentar.

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação nanoestruturados representa uma estratégia eficiente para veiculação de compostos hidrofóbicos. A escolha desses sistemas possibilita a solubilização destes ativos e, conseqüentemente, um aumento na sua eficácia e tolerabilidade. Ainda, no caso de fármacos, a especificidade e a diminuição da quantidade da dose nesses novos sistemas reduzem seus efeitos adversos.

Neste contexto, os compostos hidrofóbicos podem ser administrados como emulsões, em que a substância é dissolvida em um solvente orgânico, o qual é disperso em uma fase aquosa como gotículas e estabilizadas com um tensoativo, sendo a estabilidade coloidal destas formulações controlada pela estrutura química da interface. Neste campo, tem sido estudadas as nanoemulsões e o interesse na sua aplicação se

deve à capacidade desses sistemas em aumentar a solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de ativos hidrofóbicos; a capacidade de incorporação de ativos hidrofílicos e hidrofóbicos ao mesmo tempo e a melhoria da sua estabilidade.

Sistemas nanoestruturados apresentam uma faixa de tamanhos de 1 a 999 nm. No entanto, como sistemas de liberação de compostos, o efeito nano somente é evidenciado para sistemas na faixa de 20 a 200 nm onde é alcançada alta permeabilidade desses sistemas nas membranas biológicas e nas células.

Sendo o tamanho das gotículas nanoemulsionadas inferior a 1µm, menor que o diâmetro dos capilares sanguíneos que são de 4 µm, as nanoemulsões podem ser administradas por via intravenosa, como também, por via intramuscular e subcutânea minimizando, com isso, os riscos à saúde. Além disso, fármacos que são administrados por via parenteral atingem diretamente a circulação sistêmica, impedindo o efeito de primeira passagem ocasionado pelo metabolismo hepático.

Considerando as potencialidades dos sistemas nanoemulsionados na administração de compostos pouco solúveis, viabilizar a veiculação de um fármaco, como por exemplo, o praziquantel em nanoemulsões pode ser uma estratégia interessante para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica emulsionada para uso oral e, futuramente, também pode ser aplicado para uso parenteral, as quais até o presente não estão disponíveis comercialmente. Este fármaco pertence à classe dos anti-helmínticos de amplo espectro, sendo de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose.

Como outro exemplo, pode ser citada a elaboração de nanoemulsões contendo os agentes fotossensibilizantes

Ftalocianina de Zinco (PhyZn) e Ftalocianina de Cloro-Alumínio (PhyAl), visando melhorar a biodisponibilidade destes fármacos. As ftalocianinas são fármacos fotossensibilizantes de segunda geração que atualmente são utilizados na terapia fotodinâmica (TFD) no tratamento do câncer.

Ainda, a veiculação de vitaminas lipossolúveis em sistemas nanoemulsionados, tais como a vitamina E, pode ser bastante interessante principalmente para a indústria cosmética.

10 **OBJETIVO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a uma nanoemulsão contendo ao menos um tensoativo, um óleo e, opcionalmente um solvente. A invenção também trata do processo de produção de uma nanoemulsão contendo ao menos um composto hidrofóbico, ao menos um tensoativo, um óleo e, opcionalmente um solvente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Para se obter uma completa visualização dos objetivos da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

FIGURA 1 mostra o gráfico do tamanho de gotas da nanoemulsão contendo 5% do óleo essencial de cravo, em relação ao tempo de preparo.

FIGURA 2 mostra o gráfico do tamanho de gotas da nanoemulsão contendo o óleo essencial de cravo e o fármaco praziquantel, em relação ao tempo de preparo.

FIGURA 3 mostra os gráficos do tamanho de gotas da nanoemulsão contendo o óleo essencial de cravo, ftalocianina de ZN e Cl-Al, em relação ao tempo de preparo.

30 Figura 4 mostra o gráfico do tamanho de gotas da nanoemulsão contendo o óleo essencial de cravo e a vitamina E, em relação ao tempo de preparo.

Figura 5 mostra o gráfico do perfil toxicológico da nanoemulsão, contendo o óleo essencial de cravo e o fármaco praziquantel, na viabilidade das células Caco-2, após 5 e 24h de incubação.

5 A Figura 6 mostra os diferentes sistemas testados no estudo de transporte através das células Caco-2. (■) praziquantel solúvel em etanol e disperso em N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (HEPES), na concentração de 100µM; (♦) Nanoemulsão de óleo de laranja
10 contendo praziquantel, 1,25mg/mL em HBSS; (▲) Nanoemulsão de óleo de cravo contendo praziquantel, 5 mg/mL em HBSS; (◄) Nanopartículas de PLGA contendo PRAZIQUANTEL, 0,1mg/mL em HBSS.

DESCRIPÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 A presente invenção trata de uma nanoemulsão óleo em água consistida de ao menos um tensoativo, ao menos um óleo e, opcionalmente um ou mais solventes.

A nanoemulsão contém entre 5 a 40% massa/massa (m/m) de um tensoativo não-iônico conhecido dos especialistas na área
20 farmacêutica, como por exemplo, os tensoativos pertencentes ao grupo consistido de: copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) ou álcoois etoxilados ou uma misturas destes.

Preferencialmente, a nanoemulsão compreende entre 7 a
25 25% m/m de um tensoativo não iônico ou de misturas de tensoativos não iônicos.

A fase oleosa é consistida de entre 1 a 50% m/m de um óleo vegetal, podendo ser um óleo bruto e/ou um óleo essencial. Os óleos essenciais que podem ser usados nesta
30 invenção são, por exemplo, o óleo essencial de: capim-limão (*Cymbopogon citratus*), laranja (*Citrus sinensis*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), lima (*Citrus aurantifolia*), erva-

cidreira (*Melissa officinalis*), maracujá (*Passiflora spp*), menta (*Mentha spp*) e/ou uma mistura destes óleos essenciais.

Os óleos brutos que podem ser usados nesta invenção são, por exemplo, os óleos pertencentes ao grupo consistido de: abacate (*Persea gratissima*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*), colza (*Brassica napus*), buriti (*Mauritia flexuosa*), amêndoa (*Prunus dulcis*), semente de uva (*Vitis spp*), e/ou uma mistura destes óleos brutos. Opcionalmente pode ainda ser usada uma mistura entre um óleo essencial e um óleo bruto.

10 Preferencialmente, é empregado entre 2,5 a 20% de óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), lima (*Citrus aurantifolia*), e /ou erva-cidreira (*Melissa officinalis*). Mais preferencialmente ainda, o óleo é o essencial de laranja (*Citrus sinensis*) e/ou cravo.

15 A nanoemulsão contém ainda um ou mais compostos hidrofóbicos na razão entre 0,5:1 a 1/20 m/m. Compostos hidrofóbicos são aqueles que possuem pouca ou nenhuma solubilidade em água, e a solubilização destes compostos possibilita a produção de formulações líquidas para uso, por exemplo, tópico, oral ou parenteral.

Nesta invenção, os compostos hidrofóbicos podem ser fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, tais como: carbamazepina, dapsona, griseofulvina, ibuprofeno, nifedipina, nitrofurantoína, fenitoína, sulfametoxazol, 25 trimetoprim, ácido valpróico, ácido iopanóico, ácido nalidixico, nevirappina, rifampicina, amitriptilina, hidróxido de alumínio, furosemida, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, acetazolamida, azatioprina, albendazol, lumetfantrine, artemether, clorpromazine, 30 ciprofloxacino, clofazimina, efavirenz, diloxanida, ácido fólico, glibenclamida, haloperidol, ivermectina, lopinavir, mebendazol, mefloquina, niclosamida, pirantel, pirimetamina,

espironolactona, sulfadiazina, sulfasalazina, triclabendazole, ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloroalumínio. Ainda, vitaminas lipossolúveis como retinol, betacaroteno, tretinoína, alfacaroteno, ergocalciferol, 5 colecalciferol, didrotaquisterol, calcitriol, calcidiol, tocoferol, tocotrienol, naftoquinona, filoquinona e menatetrenona. Sendo ainda possíveis cosméticos tais como, por exemplo, metoxicinamato de octila (MCO) e produtos alimentares também lipossolúveis.

10 Preferencialmente, o composto hidrofóbico é: praziquantel, ftalocianina de zinco, ftalocianina de cloroalumínio, tocoferol ou tocotrieno.

Opcionalmente, pode ser usado aproximadamente 30% de um ou mais solventes, para compor a fase oleosa e aumentar a 15 solubilidade dos compostos hidrofóbicos. Os solventes que podem ser usados são os álcoois, tais como o etanol e o glicerol.

A nanoemulsão desta invenção tem diâmetro médio compreendido entre 1 a 200 nm, preferencialmente, entre 5 a 20 100 nm.

A invenção trata ainda do processo de produção de uma nanoemulsão óleo em água que compreende as etapas de:

- (a) Dissolução de um ou mais tensoativos em água;
- (b) Preparação da fase oleosa;
- 25 (c) Mistura das fases aquosa e oleosa.

A etapa (a) tem início pela adição de entre 5 a 40% massa/massa (m/m) de um tensoativo não-iônico em água. Os tensoativos empregados nesta invenção são pertencentes ao grupo consistido de copolímeros em bloco de poli(óxido de 30 etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO); álcoois etoxilados; ou uma misturas destes. Em seguida a solução do tensoativo em água é deixada em repouso, à temperatura de

5°C, por um período de 12 horas para a sua completa solubilização.

Preferencialmente, a nanoemulsão compreende entre 7 a 25% m/m de um tensoativo não iônico ou de misturas de tensoativos não iônicos.

A fase oleosa (b) é consistida de um óleo vegetal, podendo ser um óleo bruto e/ou um óleo essencial. Os óleos essenciais que podem ser usados nesta invenção são, por exemplo, os óleos essenciais de: capim-limão (*Cymbopogon citratus*), laranja (*Citrus sinensis*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), lima (*Citrus aurantifolia*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), maracujá (*Passiflora spp*), menta (*Mentha spp*) e/ou uma mistura destes óleos essenciais.

Os óleos brutos que podem ser usados nesta invenção são, por exemplo, os óleos de: abacate (*Persea gratissima*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*), colza (*Brassica napus*), buriti (*Mauritia flexuosa*), amêndoa (*Prunus dulcis*), semente de uva (*Vitis spp*), e/ou uma mistura destes óleos brutos.

Preferencialmente, é utilizado o óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), lima (*Citrus aurantifolia*), e /ou erva-cidreira (*Melissa officinalis*). Mais preferencialmente ainda, o óleo é o essencial de laranja (*Citrus sinensis*) e/ou cravo.

À fase oleosa, são adicionados um ou mais compostos hidrofóbicos na razão entre 0,5:1 a 1/20 m/m, sob agitação durante um período de até 10 minutos.

Os compostos hidrofóbicos possuem pouca ou nenhuma solubilidade em água. Estes compostos também são conhecidos como hidrofóbicos ou apolares, lipofílicos ou lipossolúveis. Além disso, a sua solubilização possibilita a produção de formulações líquidas para uso, por exemplo, tópico, oral ou parenteral.

Os compostos hidrofóbicos podem ser fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, tais como carbamazepina, dapsona, griseofulvina, ibuprofeno, nifedipina, nitrofurantoína, fenitoína, sulfametoxazol, trimetoprim, 5 ácido valpróico, ácido iopanóico, ácido nalidixico, nevirapina, rifampicina, amitriptilina, hidróxido de alumínio, furosemida, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, acetazolamida, azatioprina, albendazol, lumetfantrine, artemether, clorpromazine, ciprofloxacino, 10 clofazimina, efavirenz, diloxanida, ácido fólico, glibenclamida, haloperidol, ivermectina, lopinavir, mebendazol, mefloquina, niclosamida, pirantel, pirimetamina, espirolactona, sulfadiazina, sulfasalazina, triclabendazole, ftalocianina de zinco e ftalocianina de 15 cloroalumínio. Ainda, vitaminas lipossolúveis como retinol, betacaroteno, tretinoína, alfacaroteno, ergocalciferol, colecalciferol, didrotaquisterol, calcitriol, calcidiol, tocoferol, tocotrienol, naftoquinona, filoquinona e menatetrenona. Sendo ainda possíveis cosméticos tais como, 20 por exemplo, metoxicinamato de octila (MCO) e produtos alimentares também lipossolúveis.

Preferencialmente, o composto hidrofóbico empregado é o praziquantel, ftalocianina de zinco, ftalocianina de cloroalumínio, tocoferol ou tocotrieno.

25 Opcionalmente, pode ser usado um ou mais solventes, para compor a fase oleosa e aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos. Os solventes que podem ser usados são os álcoois, tais como o etanol e o glicerol.

A fase oleosa composta de um óleo ou misturas de óleos, 30 compostos hidrofóbicos e opcionalmente, um ou mais solventes, é misturada com a fase aquosa nas proporções de fase oleosa entre 0,5/1 (0,5%) a 1/5 (20%) v/v. Após a mistura das duas

fases esta é homogeneizada em equipamentos de alta energia para que ocorra uma homogeneização vigorosa, durante 1 a 15 minutos; entre 5 a 35 °C; podendo ocorrer em pressão positiva de até 125 MPa, de modo a ser obtida uma nanoemulsão O/A na
5 forma de gotículas.

A nanoemulsão O/A assim obtida ocorre na forma de gotículas manométricas, cujo diâmetro médio de acordo com as etapas acima, é compreendido entre 1 a 200 nm, preferencialmente, entre 5 a 100 nm.

10 Os equipamentos de homogeneização usados nesta etapa são pertencentes ao estado da técnica e podem, por exemplo, ser equipamentos de alta pressão (HAP) ou ultrassom (US).

As Nanoemulsão objetos desta invenção permitem um aumento do índice terapêutico de compostos hidrofóbicos, assim como menores efeitos colaterais e efeito terapêutico
15 prolongado, pois o composto se encontra solubilizado em uma fase oleosa, que por sua vez está dispersa em água na forma de nanogotículas.

Ainda, as Nanoemulsão podem ser usadas para veiculação de outros compostos hidrofóbicos, tais como as vitaminas lipossolúveis, antioxidantes usados pelas indústrias
20 cosmética, alimentar e farmacêutica.

Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem que as referidas
25 alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

Os exemplos abaixo têm meramente a função de ilustrar as concretizações da presente invenção, e não tem o intuito de restringir ou delimitar os direitos do titular, os quais
30 devem somente ser limitados ao escopo das reivindicações apresentadas.

Exemplos:

Exemplo 1: Nanoemulsão contendo o fármaco praziquantel (estudo de solubilidade):

O fármaco praziquantel foi submetido a testes de solubilidade em diferentes óleos nas concentrações de 1- 30% m/v. Foram utilizados os seguintes óleos: amêndoas, semente de uva, abacate, funcho doce, amêndoa, lipo S, buriti, miristato de isopropila, palmitato de octila e óleos essenciais, tais como, cravo, lima, menta, maracujá, capim-limão, erva cidreira e laranja. A escolha da fase oleosa para a preparação das Nanoemulsão foi feita por observação visual usando um critério qualitativo baseado na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) no capítulo denominado "Description and Relative solubility" (USP, 1995).

Exemplo 2: Preparo das Nanoemulsão contendo (ou não) o fármaco praziquantel em óleo essencial de laranja ou cravo.

As Nanoemulsão de óleo em água foram preparadas pelo método de alta energia, em Ultrassom (US) ou em homogeneizador de alta pressão. A fase oleosa consistiu (ou não) do praziquantel dissolvido no óleo essencial de laranja ou cravo, na concentração de 5% m/m da formulação. Para formação destas Nanoemulsão foi utilizado um tensoativo à base de álcool etoxilado comercial ou à base de copolímeros em bloco de PEO-PPO, os quais foram empregados na concentração de 12% m/m.

As Nanoemulsão preparadas (contendo ou não) o fármaco apresentaram boa estabilidade e tamanhos de gotas abaixo de 100 nm.

Exemplo 3: Nanoemulsão contendo fármacos à base de ftalocianina (estudo de solubilidade).

A ftalocianina de zinco (PhyZn) foi dissolvida em diversos tipos de óleos essenciais, medindo o volume de óleo necessário para solubilizar 1mg do fármaco. A cada 1 mL de

óleo adicionado, a amostra era submetida ao ultrassom e, em seguida, avaliada quanto à presença de partículas insolúveis na amostra. Este procedimento foi repetido até que a solução ficasse límpida, sem nenhum resquício de fármaco não solubilizado, ou que 10mL de óleo fossem gastos. Além dos óleos, o teste também foi realizado com o DMSO, a fim de comprovar a solubilidade da PhyZn no mesmo. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1.

Tipo de óleo	Volume necessário para solubilizar 1mg da PhyZn
Erva-cidreira	10 mL
Maracujá	10mL
Cravo	3mL
Laranja	10mL
Menta	7mL
DMSO	10mL

Tabela 1: Solubilidade da Ftalocianina de zinco em diferentes tipos de óleos.

Para caracterizar a incorporação do fármaco ao óleo, foram feitas análises de espectrometria UV, observando entre 600 - 750nm o pico característico da ftalocianina.

A solubilidade do fármaco ftalocianina de cloro-alumínio (PhyAl) também foi avaliada nestes diferentes óleos, sendo mais solúvel ainda em presença do solvente etanol.

Exemplo 4: Preparo das Nanoemulsão contendo (ou não) fármacos à base de ftalocianina em óleo essencial de cravo (contendo ou não solventes).

Três fases oleosas se mostraram boas candidatas para à elaboração de Nanoemulsão contendo as ftalocinanas: Óleo de cravo com PhyZn; Óleo de cravo com PhyAl e Óleo de cravo com PhyAl e Etanol.

Um copolímero em bloco de PEO-PPO foi utilizado no

preparo das Nanoemulsão. Estas foram preparadas em Homogeneizador de alta pressão (HAP) utilizando quantidades de tensoativo de 10 e 12% e 5, 7, 10 e 15% de cada uma das fases oleosas. As Nanoemulsão obtidas se mostraram límpidas e com pequeno tamanho de gotícula. Além disso, as formulações que continham etanol na fase oleosa apresentaram resultados ainda melhores, conseguindo Nanoemulsão com até 10% de fase oleosa, sugerindo que o etanol atue como co-tensoativo na formulação.

10 Exemplo 5: Estudo de estabilidade das Nanoemulsão

A estabilidade das Nanoemulsão o/a, obtidas em presença ou não dos compostos hidrofóbicos, foi avaliada quanto à distribuição de tamanho das gotas formadas em função do tempo após seu preparo, a fim de acompanhar a variação da distribuição de tamanho das gotas dispersas e, caso ocorra, a desestabilização destas emulsões.

Esta avaliação foi realizada analisando-se inicialmente a distribuição de tamanhos das partículas dispersas da emulsão no tempo zero. Então, a emulsão foi deixada em repouso e novas análises foram realizadas de tempos em tempos, até a observação da separação de fases destes sistemas.

O estudo foi realizado em analisador de tamanho de partículas, sendo todas as análises realizadas em triplicata. Portanto, nos gráficos obtidos, são apresentadas as curvas médias de distribuição de tamanho de partículas das emulsões, com as respectivas barras de erro.

O diâmetro médio destas partículas é mostrado nos gráficos mostrados nas Figuras 1 a 4.

30 A Tabela 2 mostra algumas das Nanoemulsão obtidas com o auxílio do equipamento US.

A Tabela 3 mostra algumas das Nanoemulsão obtidas com

o auxílio do equipamento HAP.

Formulação	Óleo de Cravo (% m/m)	PRAZIQUANTEL (% m/m)	Copolímero PEO-PPO (% m/m)	Glicerina (% m/m)
1	5	0,25	8	-
2	5	0,25	10	-
3	5	0,25	12	-
4	7	0,35	8	-
5	7	0,35	10	-
6	7	0,35	12	-
7	10	0,7	10	-
8	10	0,7	10	2
9	10	0,7	12	-

Tabela 2: Nanoemulsão preparadas em equipamento US.

Formulação	Óleo de Cravo (% m/m)	Ftalocianina (µg/mL)	Copolímero PEO-PPO (% m/m)	Etanol (% v/v)
1	5	-	10	-
2	5	-	12	-
3	7	-	10	-
4	7	-	12	-
5	10	-	12	-
6	5	-	10	0,5
7	5	-	12	0,5
8	7	-	10	0,7
9	7	-	12	0,7
10	10	-	10	1,0
11	10	-	12	1,0
12	15	-	10	-
13	5	3,3	10	-
14	5	3,3	12	-
15	7	4,7	10	-
16	7	4,7	12	-
17	5	3,3	10	-
18	5	3,3	12	-
19	7	4,7	10	-
20	7	4,7	12	-
21	5	33,3	10	0,5
22	5	33,3	12	0,5
23	7	46,7	10	0,7
24	7	46,7	12	0,7
25	10	66,7	12	1,0

Tabela 2: Nanoemulsão preparadas em equipamento HAP.

5 Exemplo 6: Estudo do perfil toxicológico das formulações contendo praziquantel em células Caco-2

A citotoxicidade de duas formulações apresentadas nesse trabalho, uma contendo óleo de laranja e a outra contendo óleo de cravo , praziquantel % e copolímero em bloco de PEO-

PPO, foi avaliada medindo a viabilidade das células Caco-2 na presença e na ausência das formulações. O método empregado nesse estudo utilizou o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS) , o qual mede a atividade mitocondrial das células. As células Caco-2 foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 250.000 células/cm² durante 72 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido de cada poço. As diferentes formulações foram diluídas em meio de cultura e adicionada em cada poço, as células foram incubadas neste meio por 5 e 24 horas a 37°C com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂. Após este tempo de incubação, 20 µL da solução de MTS (5 mg/mL) foi adicionada à cada poço e novamente incubado por 3 horas nas mesmas condições anteriores. A absorbância de cada poço foi feita por medidas espectroscópicas a 530 nm. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem de viabilidade celular, a qual é calculada pela razão entre o número de células tratadas (adição das diferentes formulações) e as células controle (apenas com meio de cultura).

A partir dos resultados obtidos foi possível determinar a citotoxicidade das formulações contendo Nanoemulsão. Mais preferencialmente as Nanoemulsão contendo o fármaco praziquantel solúvel em óleo essencial de laranja e o praziquantel solúvel em óleo essencial de cravo (Figura 5).

Exemplo 7: Estudo do transporte das formulações

Foram utilizados quatro sistemas diferentes para avaliar a taxa de absorção de PRAZIQUANTEL em células Caco-2.

A Figura 6 mostra os diferentes sistemas testados no estudo de transporte através das células Caco-2.

Após 21 dias de cultivo, as células Caco-2 foram incubadas com os respectivos sistemas na região apical, na região basolateral foi adicionado HEPES com pH 7,4. A placa

foi mantida em estufa à 37°C e após 15, 45, 90 e 120 minutos foi retirado todo o volume da região basolateral com imediata reposição do mesmo volume de DMEM com pH 7,4. Ao término dos 120 minutos, as células foram lavadas com Solução Balanceada de Hank's (HBSS) e então foi adicionado à região apical 0,2 mL de DMEM e as células incubadas por mais 22 horas. O conteúdo foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados indicam que os sistemas nanoestruturados apresentaram uma maior eficiência na permeabilidade do fármaco PRAZQUANTEL comparado com o fármaco livre em solução de etanol.

Exemplo 8: Estudo de fototoxicidade das formulações

Foram realizados estudos de toxicidade e fototoxicidade para as Nanoemulsão contendo a fotalocianina de cloroalumínio, utilizando células de adenocarcinoma de pulmão A549. Estes ensaios visam avaliar o potencial tóxico das formulações e seus componentes separados. Para este O estudo foi dividido em duas etapas: uma no escuro (Estudo de Toxicidade) e uma no claro (Estudo de Fototoxicidade). Inicialmente, as células são distribuídas em uma placa contendo 96 poços. Esta é incubada em estufa a 37°C por um período de 24 horas para que as células possam aderir ao fundo do poço. Em seguida, diferentes soluções compostas de: a nanoemulsão com o fármaco, a nanoemulsão sem o fármaco, um controle do fármaco em etanol e um controle contendo apenas salina são adicionados os poços separadamente. Após a adição das soluções, as placas são encubadas novamente por 24 horas. Passado este tempo, a placa correspondente ao ensaio de Fototoxicidade é submetida à iluminação por laser de luz vermelha e devolvida a estufa por mais 24 horas, enquanto a do ensaio de Toxicidade é mantida na estufa. Por fim, ambas

as placas são retiradas da estufa para a contagem do número de células viáveis pelo método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-diferiu tetrazolium (MTT). Foi obtido que as Nanoemulsão contendo a ftalocianina apresentaram atividade fototóxica, enquanto os outros componentes não apresentaram fototoxicidade, quando comparados ao controle. O ensaio de Toxicidade mostrou leve toxicidade da nanoemulsão contendo a Ftalocianina de cloroalumínio quando comparada ao controle, porém, pouco significativa quando comparar ao ensaio de fototoxicidade.

REIVINDICAÇÕES

1 - Nanoemulsão óleo em água caracterizada por ser consistida de 5 a 40% massa/massa (m/m) de ao menos um tensoativo, entre 1 a 50% m/m de ao menos um óleo; e, 5
opcionalmente, aproximadamente 30% de um ou mais solventes.

2 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter um tensoativo não-iônico pertencente ao grupo consistido de copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO); 10
álcoois etoxilados; ou uma misturas destes.

3 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por compreender entre 7 a 25% m/m de um tensoativo não iônico ou de misturas de tensoativos não iônicos.

15 4 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela fase oleosa ser consistida de 1 a 50% m/m de um óleo vegetal, podendo ser um óleo bruto e/ou um óleo essencial.

5 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo óleo essencial de: capim-limão 20
(*Cymbopogon citratus*), laranja (*Citrus sinensis*), cravo (*Eugenia caryophyllus*), lima (*Citrus aurantifolia*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), maracujá (*Passiflora spp*), menta (*Mentha spp*) e/ou uma mistura destes óleos 25
essenciais.

6 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo óleo bruto pertencente ao grupo consistido de: abacate (*Persea gratissima*), erva-doce 30
(*Foeniculum vulgare*), colza (*Brassica napus*), buriti (*Mauritia flexuosa*), amêndoa (*Prunus dulcis*), semente de uva (*Vitis spp*), e/ou uma mistura destes óleos brutos.

7 - Nanoemulsão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4, 5 e 6, caracterizado por empregar entre 2,5 a 20% de óleo essencial de laranja (*Citrus*

sinensis), cravo (*Eugenia caryophyllus*), lima (*Citrus aurantifolia*), e /ou erva-cidreira (*Melissa officinalis*).

8 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter um ou mais compostos hidrofóbicos
5 pertencentes ao grupo consistido de: carbamazepina, dapsona, griseofulvina, ibuprofeno, nifedipina, nitrofurantoina, fenitoína, sulfametoxazol, trimetoprim, ácido valpróico, ácido iopanóico, ácido nalidixico, nevirapina, rifampicina, amitriptilina, hidróxido de
10 alumínio, furosemida, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, acetazolamida, azatioprina, albendazol, lumetfantrine, artemether, clorpromazine, ciprofloxacino, clofazimina, efavirenz, diloxanida, ácido fólico, glibenclamida, haloperidol, ivermectina, lopinavir,
15 mebendazol, mefloquina, niclosamida, praziquantel, pirantel, pirimetamina, espironolactona, sulfadiazina, sulfasalazina, triclabendazole, ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloroalumínio. Ainda, vitaminas lipossolúveis como retinol, betacaroteno, tretinoína,
20 alfacaroteno, ergocalciferol, colecalciferol, didrotaquisterol, calcitriol, calcidiol, tocoferol, tocotrienol, naftoquinona, filoquinona e menatetrenona; na razão entre 0,5:1 a 1/20 m/m.

8 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por opcionalmente ser usado aproximadamente
25 30% de um solvente.

9 - Nanoemulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ter um diâmetro médio compreendido entre
5 a 100 nm.

30 10 - Processo de produção de uma nanoemulsão óleo em água caracterizado por compreender as etapas de:

- (a) Dissolução de um ou mais tensoativos em água;
- (b) Preparação da fase oleosa;
- (c) Mistura das fases aquosa e oleosa.

11 - Processo de produção de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela etapa (a) ter início pela adição de entre 5 a 40% massa/massa (m/m) de um tensoativo não-iônico pertencentes ao grupo consistido de copolímeros em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO); álcoois etoxilados; ou uma misturas destes, em água.

12 - Processo de produção de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pela etapa (a) deixar a solução do tensoativo em água em repouso, à temperatura de 5°C, por um período de 12 horas para a sua completa solubilização.

13 - Processo de produção de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela fase oleosa (b) ser consistida de um óleo vegetal, podendo ser um óleo bruto e/ou um óleo essencial.

14 - Processo de produção de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por adicionar um ou mais compostos hidrofóbicos na razão entre 0,5:1 a 1/20 m/m, sob agitação durante um período de até 10 minutos.

15 - Processo de produção de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelos compostos hidrofóbicos ser o praziquantel, ftalocianina de zinco, ftalocianina de cloroalumínio, tocoferol ou tocotrieno.

16 - Processo de produção de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por opcionalmente, pode ser usado um ou mais solventes.

17 - Processo de produção de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela fase oleosa ser misturada com a fase aquosa nas proporções de fase oleosa entre 0,5/1 (0,5%) a 1/5 (20%) v/v, por homogeneização vigorosa durante 1 a 15 minutos; entre 5 a 35 °C podendo ocorrer em pressão positiva de até 125 MPa, de modo a ser obtida uma nanoemulsão O/A na forma de gotículas.

18 - Uso de uma nanoemulsão óleo em água consistida de 5 a 40% massa/massa (m/m) de ao menos um tensoativo, entre 1 a 50% m/m de ao menos um óleo; e, opcionalmente, aproximadamente 30% de um ou mais solventes, caracterizado 5 por ser para a veiculação de compostos hidrofóbicos, podendo ser um fármaco, cosmético, vitamina ou um composto alimentar.

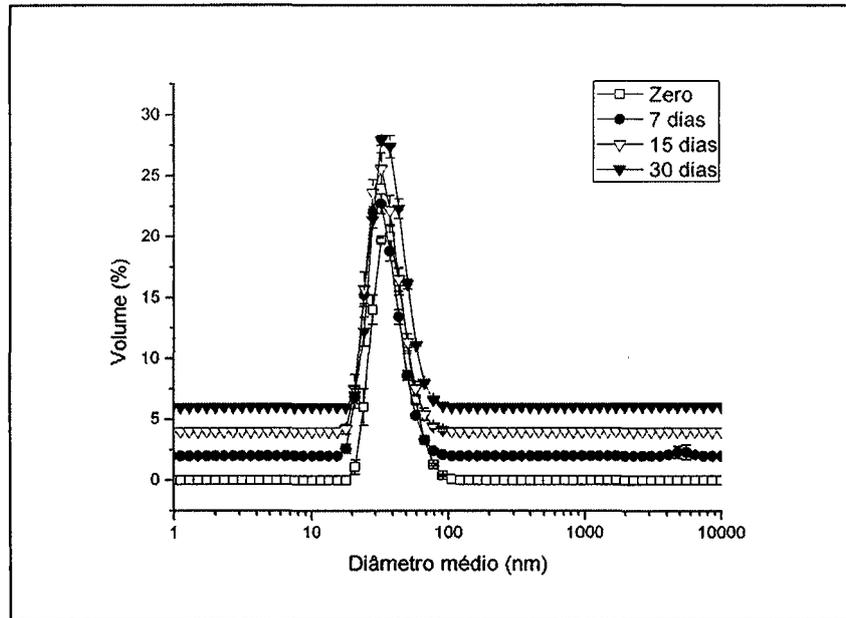


Figura 1

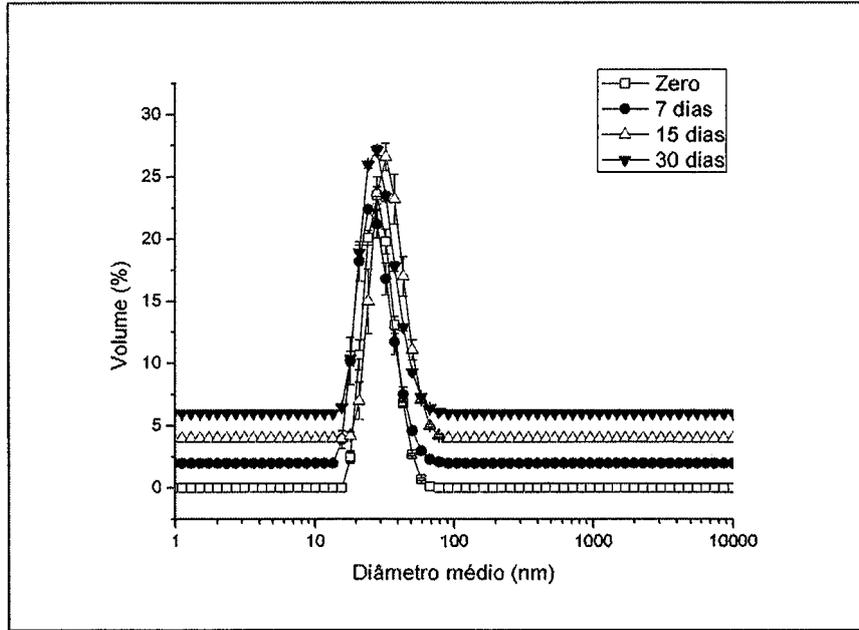


Figura 2

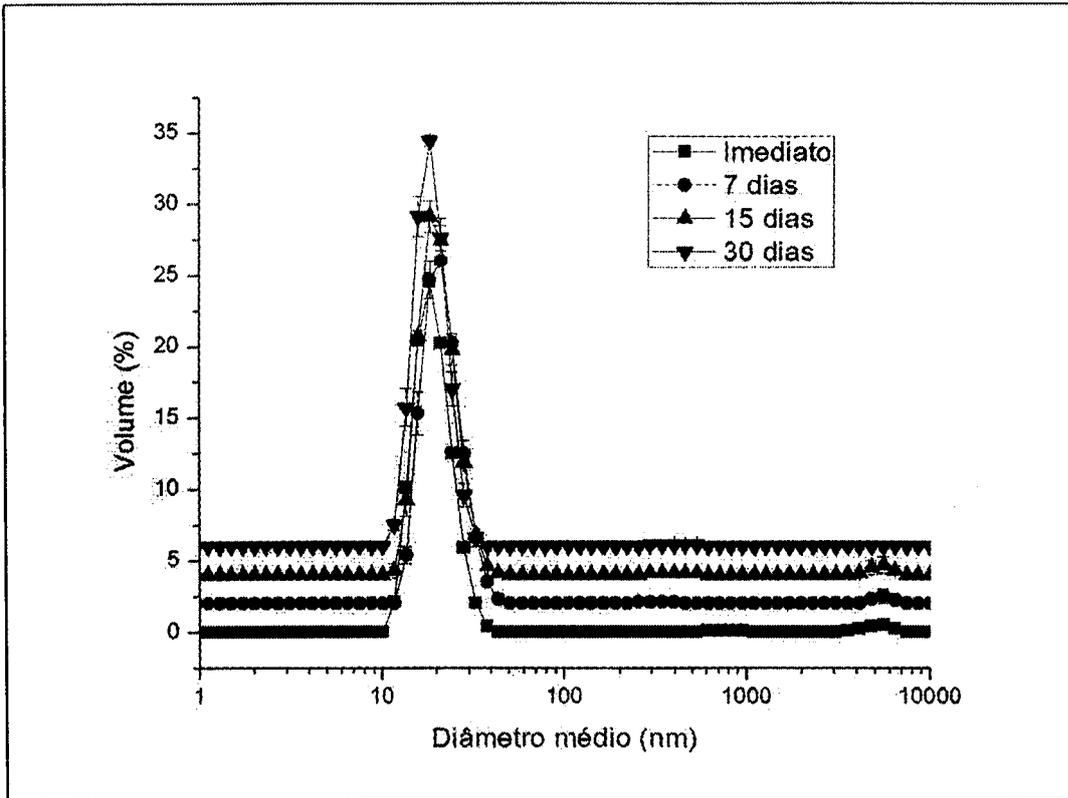


Figura 3

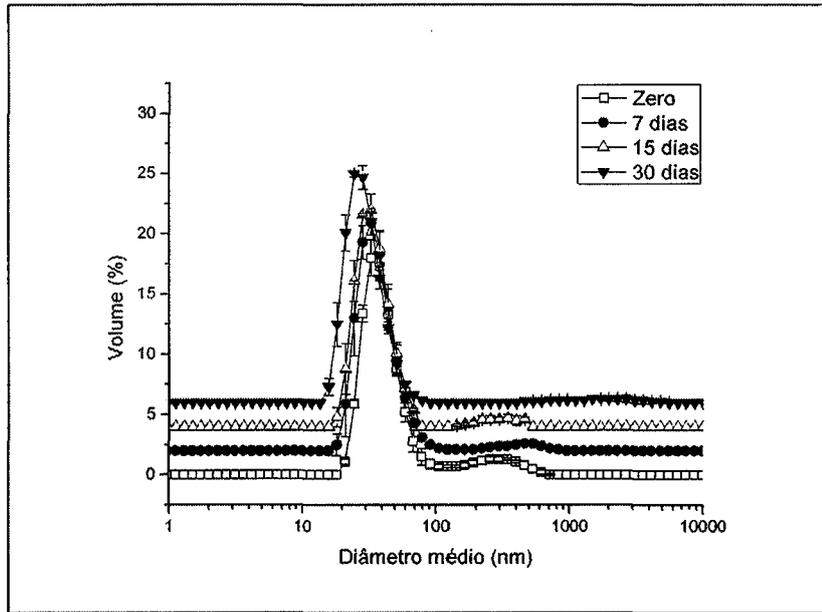


Figura 4

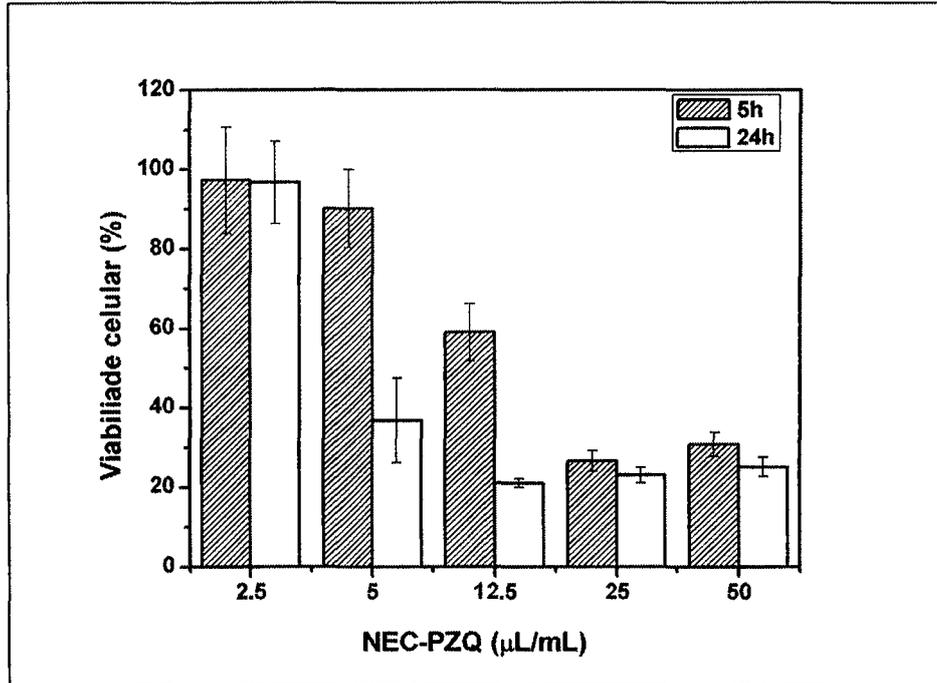


Figura 5

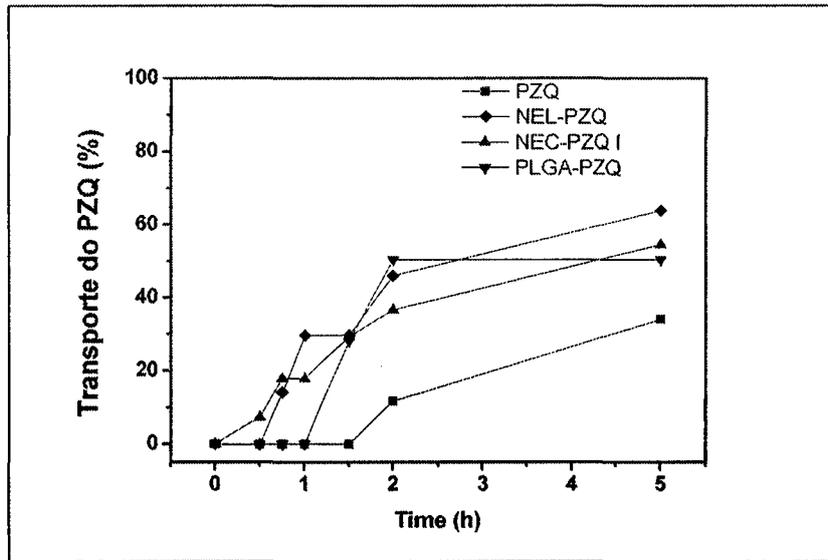


Figura 6

RESUMO

NANOEMULSÃO ÓLEO EM ÁGUA E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO

A presente invenção descreve uma nanoemulsão óleo em água consistida de entre 5 a 40% massa/massa (m/m) de ao menos um tensoativo, entre 1 a 50% m/m de ao menos um óleo; e, opcionalmente, aproximadamente 30% um ou mais solventes; seu processo de produção e ainda, seu uso na veiculação de compostos hidrofóbicos, podendo ser um fármaco, cosmético, vitamina ou um composto alimentar.