



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

(21) BR 102020024914-2 A2



(22) Data do Depósito: 07/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 14/06/2022

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA

(51) Int. Cl.: A61K 36/67; A61P 25/28.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ANDRE LUCAS CORREA DE ANDRADE; RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA; THAMIRIS PINHEIRO SANTOS; PAULO EDUARDO DA SILVA BASTOS; AMANDA RODRIGUES DOS SANTOS; ESTER INACIO DAMIAO QUINOVA; TIAGO QUEIROZ DA MOTA BITTENCOURT; CLAUDIO AUGUSTO GOMES DA CAMARA; MARCILIO MARTINS DE MORAES; PABYTON GONCALVES CADENA.

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA. A invenção pertence ao setor tecnológico de bionanotecnologia com destaque na utilização de técnicas de nanoemulsificação aplicadas à uma possível melhora das propriedades físico-químicas e fisiológicas da levodopa. Trata-se de um processo para produção de nanoemulsões O/A com vesículas de tamanho inferiores a 300 nm para encapsulação do fármaco Levodopa para melhoramento no tratamento da Doença de Parkinson, devido ao fato da Levodopa ser um fármaco com uma distribuição descontínua no organismo, tempo de meia-vida curta e baixa biodisponibilidade. A nanoemulsão é produzida pelo método de baixa energia a partir da emulsificação espontânea do óleo essencial de Piper nigrum, do surfactante polissorbato 80, da Levodopa combinada a inibidores da dopa-decarboxilase, na fase oleosa, e do tampão fosfato em pH neutro, como fase aquosa. Além disso, em sua fase oleosa devido a presença do óleo de Piper nigrum contém níveis de terpenos, compostos ativos que possuem atividade antioxidante que podem melhorar no tratamento da Doença de Parkinson.

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA”

Campo da invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção pertence ao setor tecnológico de bionanotecnologia com destaque na utilização de técnicas de nanoemulsificação aplicadas à uma possível melhora das propriedades físico-químicas e fisiológicas do fármaco Levodopa. Trata-se de um processo para produção de nanoemulsões a base de óleos essenciais para encapsulação do fármaco Levodopa visando possível associação da bioatividade deste fármaco com o óleo utilizado, consequentemente proporcionando maior eficácia no tratamento da Doença de Parkinson. A nanoemulsão produzida pelo método de baixa energia a partir da emulsificação espontânea de diversos tipos de óleos essenciais é uma opção eficiente para encapsulação de fármacos, como a Levodopa, com intuito de melhorar o tratamento da Doença de Parkinson em humanos.

Fundamentos da invenção

[002] Os distúrbios neurológicos contribuem aproximadamente para 11% da incidência total de doenças no mundo e é previsto um incremento desse número nos próximos anos devido ao envelhecimento da população global (KARAMI et al., *Drug Discov. Today*, v. 24, n. 5, p. 1104–1115, 2019). Comparativamente, entre os distúrbios neurodegenerativos, a Doença de Parkinson (DP) é a segunda mais comum após a Doença Alzheimer (DA), a prevalência de DP é aproximadamente 1% dos indivíduos acima dos 60 anos e 4% da população acima dos 85 anos (DENG; WANG; JANKOVIC, *Ageing Res. Rev.*, v. 42, p. 72-85, 2018). Paralelamente, de acordo com os dados examinados no último Estudo Global de Doença, Lesões e Fatores de Risco (GBD, do inglês: Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study) em 2016, a doença de Parkinson foi o distúrbio neurológico que mais cresceu em prevalência, incapacidade e óbitos (DORSEY et al. *Lancet Neurol.*, v. 17, n. 11, p. 939-953, 2018). Nesse mesmo

estudo, estimou-se que o número total de pessoas afetadas pela DP tenha mais que dobrado globalmente entre 1990 a 2016. A incidência da DP está ligada a fatores de risco e proteção (DE LAU; BRETELER, *Lancet Neurol.*, v. 5, n. 6, p. 525–535, 2006.; BELLOU et al., *Parkinsonism Relat. Disord.*, v. 23, n. 2015, p. 1–9, 2016). O fator de risco mais importante é a idade, mas também parece estar associado a substâncias químicas industriais e a poluentes, como pesticidas, solventes (PEZZOLI; CEREDA, *Neurology*, v. 80, n. 22, p. 2035–2041, 2013), e metais (VLAAR et al., *Eur. J. Epidemiol.*, v. 33, n. 11, p. 1101–1111, 2018).

[003] O tratamento para DP é bastante complexo e apenas sintomático, pois ainda não há tratamento efetivo, medicamento que possa interromper ou retardar o processo de neurodegeneração causado pela DP (OERTEL; SCHULZ, *J. Neurochem.*, v. 139, p. 325–337, 2016; GAO et al., *Biomaterials*, v. 194, p. 36-46, 2019). Atualmente, o tratamento para a DP inclui farmacoterapia, neurocirurgia estereotáxica funcional e terapia de suporte, como exemplo a fisioterapia, terapia da fala e medidas dietéticas (OERTEL; SCHULZ, *J. Neurochem.*, v. 139, p. 325–337, 2016). Os sintomas motores podem ser reduzidos pela utilização de fármacos que aumentam o nível de dopamina no sistema nervoso central ou mimetizam os seus efeitos (BASSANI; VITAL; RAUH, *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 73, n. 7, p. 616–623, 2015).

[004] Dentre os fármacos recomendados para o tratamento da DP, a Levodopa (LD), também chamada de L-Dopa, é considerada padrão ouro e o mais utilizado. Esse fármaco é um precursor da dopamina, que possui a função de repor os níveis deste neurotransmissor no sistema nervoso central, (BASSANI; VITAL; RAUH, *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 73, n. 7, p. 616–623, 2015). A LD é convertida em dopamina pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase no sangue (ABBOTT, *Nature*, v. 466, n. 7310, p. S6–S7, 2010).

[005] A LD é um L-isômero natural do aminoácido D, L-dihidroxifenilalanina e foi isolado pela primeira vez do feijão-fava em 1910-1911 (HORNYKIEWICZ, *J. Neurol.* v. 257, n. S.2, p. 249-252, 2010). Posteriormente, uma pesquisa realizada por Blaschko em 1942 descobriu que a enzima L-dopa descarboxilase, através da descarboxilação, converte a levodopa biologicamente inerte na catecolamina biologicamente ativa, a dopamina. Uma década depois, o efeito excitatório central da LD foi relatado pela primeira vez em

roedores, indicando a dopamina como metabólito ativo da levodopa no cérebro (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, *Nature*, v. 180, n. 4596, p. 1200–1200, 1957). Paralelamente a isso, na década de 1960 ocorre o reconhecimento que o prejuízo neuroquímico predominante da DP é uma deficiência de dopamina nas regiões do cérebro envolvidas no controle do movimento (BERTLER; ROSENGREN, *Experientia*, v. 15, n. 1, p. 10-11, 1959). Com as evidências iniciais sobre o papel da levodopa e sua relação com a DP, alguns pacientes com DP foram tratados e melhorias marcantes em alguns sintomas, como acinesia (ausência de movimentos), tremor e rigidez, foram relatadas (COTZIAS; VAN WOERT; SCHIFFER, *New England Journal of Medicine*, v. 276, n. 7, p. 374–379, 1967). Após a realização de vários testes e estudos, a agência federal dos EUA, Food and Drug Administration (FDA), aprovou a LD como tratamento para a DP em 1970 (HAUSER, *Eur. Neurol.*, v. 62, p. 1-8, 2009).

[006] Contudo, existem restrições no tratamento farmacológico da LD que incluem vários efeitos neurológicos adversos, pois muitos pacientes que responderam ao medicamento também desenvolveram flutuações motoras e discinesias (movimentos musculares anormais) (HAUSER, *Eur. Neurol.*, v. 62, p. 1-8, 2009). Na literatura farmacológica especializada em DP, há uma preocupação de longa data da qual a LD possa ser tóxica e acelerar a degeneração neuronal e progressão clínica, principalmente em tratamentos duradouros, como consequência de espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo oxidativo do fármaco (OLANOW, *Lancet Neurol.*, v. 13, n. 2, p. 141–149, 2014). Contudo, não há evidências concretas após realização de testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos que indiquem que o tratamento com LD seja tóxico ou que tenha um efeito adverso na taxa de progressão clínica (BASMA et al., *J. Neurochem.*, v. 64, n. 2, p. 825-832, 1995; DATLA; BLUNT; DEXTER, *Mov. Disord.*, v. 16, n. 3, p. 424-434, 2001). Dessa forma, continua a recomendação que os médicos realizem o tratamento por LD em dosagens baixas e que forneçam um controle clínico satisfatório, pois esse fármaco ainda é o agente antiparkinsoniano mais eficaz disponível (OLANOW, *Lancet Neurol.*, v. 13, n. 2, p. 141–149, 2014).

[007] Adicionalmente, além da problemática dos efeitos colaterais, os principais desafios farmacológicos enfrentados até hoje em relação à LD são: distribuição descontínua no organismo, tempo de meia-vida curta, baixa biodisponibilidade e janela terapêutica estreita (TAMBASCO; ROMOLI; CALABRESI, *Curr. Neuropharmacol.*, v. 16,

n. 8, p. 1239–1252, 2018). Um exemplo deste fato é que apenas 1% da dose administrada por via oral entra no cérebro para atuar efetivamente na transmissão dopaminérgica, e seu tempo meia-vida atinge apenas uma hora (HAUSER, *Eur. Neurol.*, v. 62, p. 1-8, 2009). Isso ocorre devido ao rápido metabolismo e depuração plasmática pela L-aminoácido aromático descarboxilase no sangue provocando efeitos colaterais periféricos, como náuseas e além de reduzir a quantidade de LD disponível para atravessar a barreira hematoencefálica para alcançar o cérebro (JANKOVIC, *Neurology*, v. 58, n. S1, p. S19–S32, 2002.; ABBOTT, *Nature*, v. 466, n. 7310, p. S6–S7, 2010). Como forma de resolver e mitigar a metabolização da LD em dopamina antes de atingir o cérebro, utiliza-se uma associação com inibidor da dopa-decarboxilase (DDC), como a carbidopa ou benserazida, resultando em um aumento na biodisponibilidade, melhor perfil terapêutico, eficácia prolongada e melhor tolerabilidade (CEDARBAUM, *Clin. Pharmacokinet.*, v. 13, n. 3, p. 141-178, 1987; PLETSCHER; DAPRADA, *Acta Neurol. Scand.*, v. 146, p. 26–31, 1993.; HAUSER, *Eur. Neurol.*, v. 62, p. 1-8, 2009). Complementarmente, essa associação prolonga a meia-vida periférica da LD em cerca de 90 minutos e a dose necessária é reduzida em 60-80% (CEDARBAUM, *Clin. Pharmacokinet.*, v. 13, n. 3, p. 141-178, 1987; HAUSER, *Eur. Neurol.*, v. 62, p. 1-8, 2009).

[008] Diante das dificuldades apresentadas nos tratamentos convencionais da DP, uma abordagem alternativa que tem sido seguida consiste na utilização dos fármacos da medicina convencional associados à produtos naturais para prevenção e tratamento da DP (MYTHRI et al., *Recent. Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.*, v. 6, n. 3, p. 181-200, 2012). A utilização de fitoterápicos está cada vez mais difundida, pois o uso de medicamentos derivados de plantas, como alternativa de tratamento para várias doenças, aumentou significativamente em todo mundo, estima-se que cerca de 64% das medicações terapêuticas disponíveis são derivadas de fontes naturais, principalmente botânicas (VALLI et al., *J. Nat. Prod.*, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013). Os medicamentos fitoterápicos, com sua ampla variedade de moléculas fitoquímicas, como flavonoides, taninos e terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos), revelaram benefícios protetores e terapêuticos em muitas indicações, como doenças neuropsicológicas (SHAHPIRI et al., *Rev. Neuroscience*, v. 27, n. 6, p. 651–668, 2016). Adicionalmente, estudos têm indicado que uma parte dos compostos ativos extraídos de

plantas medicinais e formulações de ervas tiveram efeitos positivos sobre os modelos de DP *in vitro* e *in vivo* (LI et al., *Fitoterapia*, v. 84, n. 1, p. 273–85, 2013).

[009] Um dos compostos que se destaca entre fármacos derivados de plantas são os óleos essenciais (OE). Os termos "óleo essencial", "óleo volátil", "óleo etérico" são usados para denominar uma substância líquida contida em células especializadas de plantas, e que é obtida usando certos métodos de extração (ANGIONI et al., *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, 2006). Os OE são líquidos, voláteis, límpidos e raramente possuem coloração, são lipossolúveis e solúveis em álcool, éter e óleos fixos, mas insolúveis em água (DHIFI et al., *Medicines*, v. 3, n. 4, p. 25-41, 2016). Os OE podem ser sintetizados em todos os órgãos das plantas, ou seja, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca de árvore (BAKKALI et al., *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008). Atualmente, são conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, 300 dos quais são importantes comercialmente, especialmente para as indústrias farmacêutica, agronômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumaria (BAKKALI et al., *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008).

[0010] Do ponto de vista químico, OE possuem misturas complexas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, aldeídos, álcoois, ésteres e outros constituintes, mas a classe de compostos predominantes é representada pelos terpenos (DHIFI et al., *Medicines*, v. 3, n. 4, p. 25-41, 2016; DA COSTA et al., *Phytother. Res.*, v. 31, n. 7, p. 959–970, 2017). Os OE contêm centenas de bioestruturas formadas por diferentes moléculas, cada uma com propriedades específicas (antisséptico, antioxidante, antibacteriano, imunoestimulante, descongestionante, entre outras) (SAMFIRA et al., *Dig. J. Nanomater. Bios.*, v. 10, n. 2, p. 557–566, 2015). Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações bastante diferentes, todos caracterizados por possuir baixo peso molecular (BAKKALI et al., *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008).

[0011] Os terpenos, compostos ativos que despertam o maior interesse biológico pelos OE, possuem em sua estrutura química básica uma unidade de isopreno (C_5H_8) (MEWALAL et al., *Trends Biotechnol.*, v. 35, n. 3, p. 227-240, 2017). De acordo com o número de unidades de isopreno, os terpenos são classificados como mono-, sesqui- (os

principais) e di-terpenos (C_{10} , C_{15} e C_{20} , respectivamente) (KIRBY; KEASLING, *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 60, n. 1, p. 335-355, 2009). Os monoterpenos são as moléculas mais representativas dos OE, compreendendo cerca de 90% de sua composição, e permitem uma grande variedade de estruturas e funções, das quais os sesquiterpenos também possuem, apesar da menor representatividade (BAKKALI et al., *Food Chem. Toxicol.*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008). Os terpenos foram os grupos mais abundantes de fitoquímicos com efeitos antiparkinsonianos bem estabelecidos (SHAHPIRI et al., *Rev. Neuroscience*, v. 27, n. 6, p. 651–668, 2016).

[0012] Numerosos estudos realizados mostraram que os OE derivados de várias espécies de plantas possuem efeitos neuroprotetivos contra condições neurodegenerativas *in vivo* e *in vitro* (CHO et al., *Toxicol. Res.*, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2017). Este fato pode ser observado a partir do estudo realizado com a aplicação do sesquiterpeno natural, o β -cariofileno, em modelos de ratos expostos à rotenona para indução da DP, na qual foi observado que o terpeno atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios no modelo animal (OJHA et al., *Mol. Cell. Biochem.*, v. 418, n. 1-2, p. 59-70, 2016). Em outra pesquisa, o tratamento com β -cariofileno impediu os fenótipos da Doença de Alzheimer, tais como o comprometimento cognitivo e ativação da inflamação através da ativação do receptor CB2 e da via PPAR γ (CHENG; DONG; LIU, *Pharmacology*, v. 94, n. 1-2, p. 1–12, 2014). Visto que os terpenos são os principais componentes dos OE de várias plantas com funções neuroprotetoras, estudos para descobrir os papéis benéficos dos terpenos nas doenças neurodegenerativas fornecerão uma maneira promissora de desenvolver tratamentos (CHO et al., *Toxicol. Res.*, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2017). Percebe-se a importância dos terpenos à medida que surgem patentes como a US 2012/0213727 A1 e EP 2493461 B1 propõem métodos de uso terapêutico de monoterpenos sintéticos com potente atividade de indução de regeneração de uma grande variedade de tipos de células, incluindo as neuronais. Os monoterpenos sintéticos utilizados nessas invenções, entre eles o limoneno, α -pineno, β -pineno e γ -terpineno, podem ser utilizados como ingredientes ativos em composições farmacêuticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DP.

[0013] Uma das espécies de plantas que possui em seu OE consideráveis níveis de terpenos é a Pimenta Negra (*Piper nigrum*), uma das mais antiga e popular especiarias

do mundo, na qual o óleo volátil é extraído dos frutos por destilação a vapor e bem conhecido por possuir propriedades antibacterianas e antifúngicas (SINGH et al., *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, p. 1878-1884, 2004). Além das propriedades citadas, estudos têm demonstrado que o OE de *P. nigrum* também possui atributos antioxidante que eliminam os radicais livres formados de fontes endógenas e exógenas do organismo que está relacionado com a etiologia de diversas doenças, entre elas neurodegenerativas, como a DP (HALLIWELL, *Cardiovasc. Res.* v. 47, p. 410-418, 2000; JEENA et al., *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, v. 17, p. 1-12, 2014).

[0014] Outro importante componente fitoquímico é o alcaloide piperina (1- [5- (1, 3-benzodioxol-5-il) -1-oxo-2, 4-pentadienil] piperidina), um dos principais componentes das espécies de pimenta, incluindo a espécie *P. nigrum* (SRINIVASAN, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007; STOJANOVIĆ-RADIĆ et al., *Appl. Sci.*, v. 9, n. 20, p. 4270-4299, 2019). Devido à presença desse alcaloide, a pimenta negra tem sido pesquisada e descrita por apresentar efeitos antipiréticos, anti-inflamatórios e antioxidantes em roedores como modelos animais (LEE; SHIN; WOO, *Arch. Pharm. Res.*, v. 7, n. 2, p. 127–32, 1984; VIJAYAKUMAR; SURYA; NALINI, *Redox Report*, v. 9, n. 2, p. 105–110, 2004; PATHAK; KHANDELEWAL, *Eur. J. Pharmacol.*, v.576, n. 1-3, p. 160-170, 2007). Foi observado, em outras pesquisas, a capacidade da piperina em inibir as enzimas mitocondriais monoamina oxidase B (MAO-B) e a monoamina oxidase A (MAO-A), que possuem um papel fundamental no metabolismo de neurotransmissores do SNC e estão envolvidas no metabolismo da dopamina (LEE et al., *Chem. Pharm. Bull.*, v. 53, v. 7, p. 832-835, 2005; MAO et al., *Cell Mol. Neurobiol.*, v. 32, n. 4, p. 531-537, 2012). Devido às evidências experimentais sustentarem o conceito de que o estresse oxidativo e a deficiência do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial desempenham um papel central na patogenia da DP, estudos sobre fármacos inibidores das enzimas MAO, tendo como alvo doenças neurodegenerativas, têm sido realizadas (BINDA et al., *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 11, p. 2788-2796, 2011; WRANGEL et al., *Behav. Brain Res.*, v. 279, p. 52–61, 2015). Em estudos *in vitro*, a piperina foi responsável por aumentar a viabilidade celular e restaurar o funcionamento mitocondrial e de neurônios primários em células induzidas à neurotoxicidade por rotenona, um pesticida utilizado para induzir neurotoxicidades semelhantes à da DP (LIU et al., *Oncotarget.*, v. 7, n. 38, p. 60823–60843, 2016; STOJANOVIĆ-RADIĆ et al., *Appl. Sci.*, v. 9, n. 20, p. 4270-4299, 2019).

Em outros estudos com esse alcaloide, foi observado efeitos protetores contra a indução de neurotoxicidade pelo composto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), uma substância comumente utilizada para indução da DP em modelos animais (YANG et al., *Int. J. Mol. Med.*, v. 36, p. 1369-1376, 2015; SINGH; JAMWAL; KUMAR, *Neural Regen. Res.*, v. 12, n. 7, p. 1137-1144, 2017). Em pesquisas *in vivo* com ratos como modelo animal da DP, induzidos por 6-OHDA, foi observado que o tratamento com esse bioativo da *P. nigrum* gerou efeitos de inibição da apoptose de células neuronais (SHRIVASTAVA et al., *J. Nutr. Biochem.*, v. 24, n. 4, p. 680-687, 2013; CORREIA et al., *J. Neurol. Ther.*, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2015).

[0015] Outras pesquisas com a piperina investigam as capacidades de aumentar a biodisponibilidade de fármacos no organismo, incluindo a biodisponibilidade da LD (DHAWAN; SUBBURAJU, *Int. J. Pharm. Pharm. Res.*, v. 3, n. 4, p. 474-481, 2014). Em uma dessas pesquisas foi realizado um teste de biodistribuição dos fármacos vasicina e esparteína associados à piperina e como resultados foi observado que os níveis no sangue foram aumentados aproximadamente em 233 e 100%, respectivamente, de acordo com os autores esse aumento foi promovido pela rápida absorção no trato gastrointestinal ou pela prevenção da metabolização do fármaco na primeira passagem através do fígado (ATAL et al., *J. Ethnopharmacol.*, v. 4, n. 2, p. 229-232, 1981). Resultados de aumento de biodisponibilidade foram também observados em outros fármacos, como carbamazepina, clorzoxazona, fexofenadina, diclofenac, dexibuprofeno (DI PIERRO; SETTEMBRE, *J. Pain Res.* v. 6, p. 497-503, 2013) e nos compostos resveratrol e nevirapina (KASIBHATTA; NAIDU, *Drugs R. D.*, v. 8, n. 6, p.383-91, 2007). Os mecanismos que permitem que a piperina melhore a biodisponibilidade de fármacos são a sua capacidade de inibir várias enzimas responsáveis por metabolizar os fármacos, estímulo à atividade de transportadores de aminoácidos no revestimento intestinal, inibição da proteína que remove substâncias das células, a glicoproteína-P, assim, diminuindo a produção do ácido glucurônico no intestino, dessa forma permitindo que mais substâncias entrem no corpo em sua forma ativa (DEROSA; MAFFIOLI; SAHEBKAR, *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 928, p. 173-184, 2016).

[0016] Apesar dos benefícios, a eficácia de muitos compostos fitoterápicos depende de uma boa biodisponibilidade, o que pode limitar sua aplicação em sistemas farmacológicos (CODEVILLA et al., *CeN*, v. 37, n. 2, p. 142, 2015). Essa limitação se

deve ao fato que os constituintes dos OE, por exemplo os terpenos, são altamente solúveis em água, mas demonstram uma baixa absorção, pois são incapazes de cruzar membranas lipídicas, têm tamanhos moleculares altos e demonstram pouca absorção, resultando em perda de biodisponibilidade e eficácia. (BONIFÁCIO et al., *Int. J. Nanomedicine*, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2014). Como forma de contornar tais limitações, é necessário a utilização de técnicas que permitirão o desenvolvimento de fármacos nanotecnológicos mais estáveis, biodisponíveis e capazes de permanecer mais tempo circulando no organismo sem serem degradados (CODEVILLA et al., *CeN*, v. 37, n. 2, p. 142, 2015).

[0017] Uma técnica bastante utilizada para gerar aumento da biodisponibilidade de substâncias é a produção de sistemas nanoestruturados a partir de nanoemulsões. Nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis, por exemplo óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), estabilizados pelo uso de um surfactante apropriado (MANSON et al., *J. Condens. Matter Phys.*, v. 18, n. 41, p. R635–R666, 2006; LIAO et al., *J. Food Eng.*, v. 281, p. 110000, 2020.). As nanoemulsões são feitas com a utilização de surfactantes aprovados para consumo humano e substâncias alimentares comuns, denominadas “Generally Recognized as Safe” (GRAS) pelo Food and Drug Administration (FDA) (LOVELYN; ATTAMA, *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, v. 2, n. 5, p. 626-639, 2011). O diâmetro médio de vesículas de nanoemulsão é de até 300 nm (ANTON; VANDAMME, *Pharm. Res.*, v. 28, n. 5, p. 978–985, 2011; MCCLEMENTS, *Soft Matter*, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012). Adicionalmente, o diâmetro da vesícula pode influenciar na aparência da nanoemulsão, quando o tamanho da vesícula é inferior a 200 nm a emulsão possui aparência translúcida e quando possui o tamanho entre 200 a 500 nm, a aparência fica leitosa (CAPEK, *Adv. Colloid Interface Sci.*, v. 107, n. 2–3, p. 125–155, 2004).

[0018] O alcance das aplicações das nanoemulsões espalha-se em diversos campos, incluindo a indústria farmacológica, que tem utilizado nanoemulsões de O/A para facilitar a liberação controlada de fármacos no organismo (ZAINOL et al., *Int. J. Mol. Sci.*, v. 13, n. 12, p. 13049-13064, 2012; PANGENI et al., *Nanotechnology*, v. 25, n. 48, p. 485102, 2014; GABA et al., *Biomed Res. Int.*, v. 2019, p. 1-20, 2019). Na indústria alimentícia, na qual utiliza-se de nanoemulsões aromatizadas para encapsular, proteger e fornecer componentes funcionais lipofílicos, como lipídios biologicamente ativos (por exemplo,

ácidos graxos) e sabores, vitaminas, conservantes e nutracêuticos solúveis em óleo (MCCLEMENTS; RAO, *Crit. Ver. Food Sci.*, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, *J. Colloid Interf. Sci.*, v. 388, n. 1, p. 95–102, 2012). Na indústria agrônômica, a partir da aplicação de nanoemulsões de O/A para solubilização e liberação de pesticidas hidrofóbicos com objetivo de aumentar a eficácia (WANG et al., *J Colloid Interf Sci*, v. 314, n. 1, p. 230-235, 2007; FENG et al., *Nanoemulsions*, p. 379-413, 2018). Na indústria de cosméticos, com aplicação de técnicas de nanoemulsão O/A permite aumentar a proporção superfície-volume que melhora a penetração e permeabilidade do ingrediente ativo na pele (SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, *Adv. Colloid Interface Sci.*, v. 108-109, n. 3, p. 145-149, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN; YUKUYAMA; PIZZINO, *Nanoemulsions*, p. 435-475, 2018). Adicionalmente, essas vesículas podem ser utilizadas em várias formas, como líquidos, cremes, sprays, géis, aerossóis e espumas. Também podem ser administradas por variadas vias, como a tópica, oral, intravenosa, intranasal, pulmonar e ocular (SINGH et al., *J. Control Release*, v. 252, p. 28–49, 2017).

[0019] A preparação desse tipo de vesícula é tipicamente realizada em um processo de dois passos na qual uma macroemulsão é primeiramente formulada e então convertida em uma nanoemulsão no segundo passo (GUPTA et al., *Soft Matter*, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016). Nas últimas décadas, a formulação de nanoemulsões tem sido focada em vários métodos, divididos em dois principais: método de alta ou baixa energia. O método de alta energia, tal como homogeneização de alta pressão (HAP) e ultrassonicação consome exageradamente energia para produzir pequenas vesículas (FYRD; MASON, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, v. 63, n. 1, p. 493–518, 2012). Por outro lado, métodos de baixa energia exploram propriedades específicas do sistema para fazer pequenas vesículas sem consumir muita energia. Os métodos de baixa energia mais utilizados são: ponto de inversão da emulsão (PIE ou EPI do inglês: emulsion inversion point) (IZQUIERDO et al., *Langmuir*, v. 18, n. 1, p. 26–30, 2002), temperatura de inversão de fase (TIF ou PIT do inglês: phase inversion temperature) (FORGIARINI et al., *Progr Colloid Polym Sci*, v. 118, p. 184-189, 2001). Além desses métodos de baixa energia, as nanoemulsões podem ser formadas por meio de emulsificação espontânea, na qual a formação da vesícula pode ser alcançada pelo contato de dois líquidos imiscíveis que

não estão em equilíbrio, sem a necessidade de entrada de energia externa (SOLANS; MORALES; HOMS, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, v. 22, p. 88–93, 2016).

[0020] As nanoemulsões preparadas por métodos de baixa energia frequentemente requerem grandes quantidades de surfactantes para estabilização das vesículas (SINGH et al., *J. Control Release*, v. 252, p. 28–49, 2017). Todos os surfactantes são classificados de acordo com seu Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL), um valor teórico que varia entre 1 até aproximadamente 50. Os surfactantes mais hidrofílicos têm valores de EHL superiores a 10 (exemplo: Tween 80®, com EHL = 15,0), enquanto os surfactantes mais lipofílicos apresentam valores de EHL entre 1 a 10 (exemplo: Span 80®, com EHL = 4,3) (BOUCHEMAL et al., *Int. J. Pharm.*, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004). Diante disto, uma emulsão é considerada estável quando nenhuma ou ínfima mudança ocorre em relação ao tamanho de vesícula da fase dispersa num determinado intervalo de tempo (FYRD; MASON, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, v. 63, n. 1, p. 493–518, 2012). Pois as emulsões apresentam uma tendência natural para separar-se em suas duas fases constitutivas diminuindo a área interfacial e conseqüentemente a energia interfacial. A utilização desses surfactantes tensoativos não-iônicos é que confere a estabilização estérica entre as vesículas, mitigando a possibilidade de coalescência, assim como pela superação da força da gravidade atuante nessas vesículas pelo movimento browniano presente nesses sistemas, evitando, dessa forma, processos de instabilidade (TADROS et al., *Adv. Colloid Interface Sci.*, v. 108–109, p. 303–318, 2004; FERNANDEZ et al., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, v. 251, n. 1–3, p. 53–58, 2004). O tamanho granulométrico do sistema de nanoemulsão também previne o fenômeno da coalescência, pois essas vesículas não são facilmente deformáveis. A grande espessura da película interfacial, relativo ao tamanho da vesícula, previne que a diminuição natural dessa película seja suficiente para causar o rompimento da vesícula (IZQUIERDO et al., *Langmuir*, v. 18, n. 1, p. 26–30, 2002; MOREIRA DE MORAIS et al., *J. Disper. Sci. Technol.*, v. 27, n. 1, p. 109–115, 2006).

[0021] Adicionalmente, algumas das excelentes propriedades das nanoemulsões, como a dispersão coloidal dos agentes terapêuticos hidrofóbicos, o transporte celular por vias paracelulares ou transcelulares, impedindo que as substâncias retidas sofram degradação enzimática e/ou hidrólise, e, por fim, sua notável biocompatibilidade, tornam-nas altamente promissoras para técnicas avançadas de distribuição de fármacos

(KADAPPAN et al., *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 62, n. 4, p. 1700836, 2018). Sistemas de nanoemulsão são potenciais carreadores para entrega eficiente de fármacos através da barreira hematoencefálica, tornando-se uma alternativa farmacológica para o tratamento da DP por Levodopa (ZAINOL et al., *Int. J. Mol. Sci.*, v. 13, n. 12, p. 13049-13064, 2012). Geralmente, esses sistemas são biocompatíveis, biodegradáveis, fisicamente estáveis e relativamente fáceis para produção em larga escala utilizando tecnologia comprovada (LI et al., *Int. J. Pharm.*, v. 356, n. 1–2, p. 282–290, 2008). Sua natureza não tóxica e não irritante faz com que estes sistemas sejam ideais, visto que não danificam as células humanas ou animais (ABOOFAZELI, *Iran J. Pharm. Res.*, v. 9, n. 4, p. 325–326, 2010).

[0022] Diante do exposto, torna-se claro que a formulação de nanoemulsões por emulsificação espontânea possui várias vantagens em potencial, entre elas estão a simplicidade de implementação. Sendo assim, a produção de nanoemulsões a base de óleos essenciais contendo Levodopa encapsulada para tratamento da Doença de Parkinson é necessária por apresentar um método eficiente para a utilização deste fármaco de forma mais segura e eficiente, pois possibilita o aumento de sua biodisponibilidade promovendo redução dos efeitos colaterais.

[0023] Nas bases de referências patentárias foram localizados documentos contendo processos de produção de emulsões com diversos métodos e composições, diferindo da presente invenção, como descritos a seguir.

[0024] O documento WO 2005/041924 A2 descreve métodos, substâncias, dosagens e composições para formulação do fármaco Levodopa e/ou Carbidopa para tratamento da Doença de Parkinson. Um dos métodos descritos nesse documento envolve a formulação por meio do processo de emulsificação espontânea utilizando óleos de origem natural, como óleo de amendoim, soja, coco, rícino ou milho e surfactantes a fase oleosa. O documento difere da presente invenção em sua composição por não possuir óleo essencial com propriedade antiparkinsoniana.

[0025] O documento US 2011/0195030 A1 relata o melhoramento de propriedades farmacológicas de agentes terapêuticos a partir de composição de nanocápsula e nanoemulsão compreendendo uma fase oleosa, um surfactante e opcionalmente um co-surfactante. A fase oleosa apresentada neste documento envolve o uso de

monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, éster de propileno glicol ou diéster de propileno glicol, na qual será misturada por agitação com o surfactante ou surfactante mais co-surfactante sem necessidade de agitação mecânica de alta pressão ou microfluidização produzindo vesículas de nanoemulsão e partículas de nanocápsulas com tamanho menores que cerca de 300 nm. O documento citado propõe em sua fase oleosa a utilização de óleos fixos formados por glicerídeos, que possuem apenas a função de formar estruturalmente a nanoemulsão, enquanto na fase oleosa da presente invenção é utilizado um óleo essencial formado por monoterpenos e sesquiterpenos, que além de fazer parte da composição das nanoemulsões, possuem efeitos antiparkinsonianos comprovados. Outro aspecto que difere entre as invenções é o tamanho das vesículas de nanoemulsão, na qual a presente invenção propõe um processo que forma vesículas inferiores a 200 nm, que possuem propriedades biológicas mais vantajosas para absorção e biodisponibilidade.

[0026] O documento US 8513311 B2 descreve um método de formulação de emulsão espontânea de óleo em água (O/A) de tamanho nanométrico que varia de 0,5 a 200 nm e que pode conter um fármaco ou outras substâncias químicas. A fase oleosa desse método permite a utilização de variados grupos de óleos, como óleo minerais, óleos vegetais fixos ou essenciais, vitaminas lipofílicas, terpenos e misturas destes. O método propõe a adição de surfactantes que possuam um valor de EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo) inferior a 8 e sua fase aquosa composta por água ou um líquido polar não-aquoso. Adicionalmente, o documento WO 2003/105607 A1 relata o uso de emulsões espontâneas com tamanho nanométrico e seu uso como transportadores adequados e eficazes para liberação de componentes ativos para o corpo humano. O processo de formulação proposto por esse documento possui uma fase aquosa compreendendo água, co-surfactante e um co-solvente e uma fase oleosa consistindo em diferentes tipos de óleos naturais ou sintéticos com ao menos um surfactante de natureza hidrofílica. Os documentos diferem em sua composição já que a presente invenção apresenta a produção de nanoemulsões usando óleos essenciais contendo LD nanoencapsulada com possível associação dos efeitos terapêuticos do óleo.

[0027] O documento WO 2019/145773 A1 refere-se a um processo de encapsulação de fármacos, como a Levodopa, por meio de lipossomas com tamanho de 300 nm para uso no tratamento e/ou prevenção de doenças neurodegenerativas. Apesar de encapsular

Levodopa em vesículas de tamanho nanométrico, esse documento difere da presente invenção em sua composição por propor a utilização de outro sistema nanotecnológico.

[0028] O documento BR 112019014103-0 A2 apresenta um processo para a produção e composição de uma nanoemulsão óleo em água, na qual sua fase oleosa é composta por triglicerídeos e/ou vaselina e ácidos graxos, e uma fase aquosa contendo surfactante que compreendem os sais específicos de derivados de N-acila de amino ácidos dicarboxílicos para formar nanoemulsões variando a partir de 20 a 400 nm. Esse documento difere da presente invenção em sua composição por não utilizar óleos essenciais e polissorbato 80 como surfactante.

[0029] O documento WO 2004/002507 A1 descreve um método de tratamento da Doença de Parkinson e outras condições neurológicas e doenças neurodegenerativas a partir da utilização de extratos aquosos de plantas. O documento citado apresenta a composição dos extratos aquosos das plantas Acácia-branca (*Moringa oleífera*), Pimenta Negra (*Piper nigrum*) e Tabaco (*Nicotiana tabacum*) associado com um transportador farmacologicamente aceitável. O documento difere da presente invenção em relação a sua composição por não conter óleos essenciais e nem métodos para a produção de produtos nanotecnológicos, pois não apresenta a formulação de vesículas em tamanho nanométrico para encapsulação de LD.

[0030] O documento WO 2013/168090 A1 relata o processo de utilização de formulações do óleo essencial de Gerânio (*Pelargonium graveolens*) para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer. Os inventores propõem o uso desse óleo essencial pois seus constituintes são Citronelol, Linalol, Mentona e Isomentona que atuam como inibidores naturais de acetilcolinesterase. O documento difere da presente invenção em sua composição e método pois não apresenta um sistema nanotecnológico a base de óleo essencial para encapsulação de LD.

[0031] O documento WO 2013/108254 A1 refere-se ao método para aumentar a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral utilizando formulação de nanolipoesferas com incorporação de piperina, um componente das plantas Pimenta Negra (*Piper nigrum*) e Pimenta-longa (*Piper longum*). O método de preparação das

nanolipoesferas com piperina incorporada é baseado em uma solução contendo o fármaco, um triglicerídeo de cadeia longa, um fosfolípídeo, mistura de surfactantes e um solvente orgânico, capaz de formar vesículas de tamanho menores que cerca de 500 nm. O documento difere da presente invenção em composição e método pelo fato de não usar o óleo essencial como componente para a produção de nanoemulsões contendo LD.

[0032] O documento US 2015/0044314 A1 refere-se ao método de utilização de emulsões do óleo fixo da semente de romã (*Punica granatum*) para prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas. Esse método propõe que as vesículas do óleo de romã sejam formuladas por meio da emulsão do óleo em água, sendo a fase oleosa composta pelo óleo fixo da semente de romã, ao menos um agente emulsificador ou um surfactante e uma fase aquosa para formar vesículas entre 0,03 a 1 µm de tamanho. Mesmo abordando o uso de óleos vegetais com objetivo de possivelmente tratar doenças neurodegenerativas, o documento difere da presente invenção pois não usa óleo essencial para formulação de nanoemulsão nem a encapsulação de LD.

[0033] Em conformidade com o descrito no estado da técnica, documentos que divulguem, antecipem ou sugere os elementos contidos na presente invenção não foram encontrados. Adicionalmente, de acordo com o estado da técnica, é demonstrado que existe espaço para proposição de um novo produto para o aumento da eficiência da Levodopa com objetivo de reduzir seus efeitos colaterais e consequentemente o melhoramento do tratamento da Doença de Parkinson.

Descrição da invenção

[0034] O presente pedido de patente de invenção compreende um processo de formulação de nanoemulsões que utiliza como material lipídico o óleo essencial (OE) para encapsulação do fármaco Levodopa. Para fins desta invenção, o OE utilizado foi o de *Piper nigrum*, conhecida como Pimenta Negra, que é um líquido de coloração marrom-esverdeado de odor característico.

[0035] A caracterização do OE de *P. nigrum* foi realizada por meio de Cromatografia Gasosa (GC) quantitativa, sendo a quantidade de cada composto ativo do OE calculada a partir das áreas dos picos obtidos na GC e expressa como uma porcentagem relativa

da área total dos cromatogramas de análises realizadas em triplicatas. Em relação à análise qualitativa, foi utilizado a Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (CG-EM) com um sistema detector de seleção de massa que permitiu a identificação dos componentes baseada nos índices de retenção do CG-EM com referência a uma série homóloga de n-alcanos calculada pelo uso da equação de Van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, *J. Chromatogr.*, v. 11, p. 463-471) e pela identificação dos espectros de massa publicados na literatura (ADAMS, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, p. 804, 2007). De acordo com as metodologias descritas, a composição do OE de *P. nigrum* compreende 51,44% de monoterpenos e 45,01% de sesquiterpenos (total de 96,45%), sendo os principais componentes ativos: β -cariofileno (32,88%), limoneno (15,38%) e β -terpineno (12,72%). O β -cariofileno possui alta atividade na redução da disfunção mitocondrial e no estresse oxidativo intracelular, possíveis causadores de doenças neurodegenerativa como a DP (CHOI et al., *Am. J. Pathol.*, v. 182, n. 3, p. 928-939, 2013), o limoneno e o α -terpineno também tiveram suas atividades antioxidantes comprovadas (RUBERTO; BARATTA, *Food Chem.*, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000; CHO et al., *Toxicol. Res.*, v. 33, n. 2, p. 97-106, 2017). O OE de *P. nigrum* possui múltiplas aplicações industriais pois possui atividade antioxidante devido a presença dos compostos terpenos (BAGHERI; MANAP; SOLATI, *Talanta*, v. 121, p. 220-228, 2014). Adicionalmente, não foram encontradas atividades tóxicas para seres humanos, sendo permitido o uso desse OE em diversas áreas como a farmacêutica. (ISMALI et al., *Afr. J. Biochem. Res.*, v. 11, n. 10, p. 58-71, 2017). Por fim, o óleo essencial utilizado na presente invenção é comercial, o que proporciona uma concentração de mono e sesquiterpenos padronizadas, e a espécie *P. nigrum* não é uma planta brasileira.

[0036] Para fins desta invenção, a Levodopa (LD) foi utilizada como o principal agente antiparkinsoniano em diferentes concentrações como 1% a 3% (p/p), preferencialmente 2% (p/p) do peso total da nanoemulsão. Em combinação à LD, pode ser utilizado os inibidores da dopa-descarboxilase com objetivo de ajudar na preservação do efeito terapêutico e diminuir a degradação periférica da LD, evitando principalmente os efeitos colaterais sistêmicos do fármaco, dentre os inibidores, podem ser usados o Cloridrato de Benserazida ou Carbidopa.

[0037] Para fins desta invenção, as formulações das nanoemulsões se deram a partir das seguintes fases: i. Fase Oleosa composta pelo óleo essencial, preferencialmente 10% (p/p), um surfactante, preferivelmente polissorbato 80 com 10 a 20% (p/p), preferencialmente, 12% (p/p) e uma solução de LD com pelo menos um inibidor da dopa-decarboxilase, com 1% a 3% (p/p), preferencialmente com 2% (p/p). ii. Fase aquosa composta por agentes tamponantes para a faixa de pH neutra, preferencialmente por solução tampão fosfato ou tampão fosfato salino (PBS) a 0,1 M com pH 7,4, compreendendo 70% a 80% (p/p), preferencialmente 78% (p/p) do peso total da formulação.

[0038] O processo de preparação das nanoemulsões compreende as seguintes etapas: I. Adição do óleo essencial, surfactante e LD com pelo menos um inibidor da dopa-decarboxilase para formar a Fase Oleosa; II. Homogeneização da Fase Oleosa; III. Separação do agente tamponante representando a Fase Aquosa; IV. Adição do conteúdo da fase aquosa à oleosa; V. Homogeneização da mistura.

[0039] Em uma realização preferencial, a etapa II. de homogeneização da Fase Oleosa é realizada sob agitação constante em uma Força Centrífuga Relativa (FCR) de 72 g por 30 minutos.

[0040] Em uma realização preferencial, a etapa IV. da adição do conteúdo da fase aquosa à fase oleosa compreende realização lenta e constante.

[0041] Em uma realização preferencial, a etapa V. da homogeneização das duas fases ocorre sob agitação constante, em uma Força Centrífuga Relativa (FCR) de 72 g por 60 minutos.

[0042] A presente invenção poderá ser aplicada na forma de comprimido, capsulas, pastilhas ou na forma líquida e pode conter aditivos e adjuvantes farmacêuticos convencionais, como excipientes, diluentes, ligantes, lubrificante, deslizante, conservantes, estabilizadores, agentes emulsificantes, tampões, lubrificantes, corantes, agentes umectantes, agentes de enchimento e similares. Adicionalmente, a nanoemulsão proposta na presente invenção também poderá ser aplicada na forma de adesivos transdérmicos, gel de aplicação tópica transcutânea ou aplicação por vias

inalatórias. Já é conhecido no estado da técnica que sistemas nanotecnológicos podem ser administrados por diferentes vias.

[0043] A formulação da nanoemulsão O/A foi realizada em escala de bancada bem como sua caracterização físico-química de acordo com o exemplo descrito a seguir.

Exemplo: Produção e caracterização da nanoemulsão em escala de bancada

[0044] Para a produção da nanoemulsão para um peso final de 5,0 gramas (g), o processo consistiu nas seguintes fases: 1. Fase Oleosa: composta pelo i. óleo essencial de *Piper nigrum* com peso fixo de 0,50 g em todas as formulações; ii. polissorbato 80 (Tween 80®) com peso entre 0,50 a 1,00 g; iii. Levodopa combinada com cloridrato de benserazida com peso fixo final de 0,10 g. Todos os compostos (i., ii., e iii.) foram pesados em balança analítica separadamente e após isso, adicionados em um mesmo béquer para iniciar o processo de mistura em um agitador magnético à Força Centrífuga Relativa (FCR) de 72 g por 30 minutos. 2. Fase aquosa: contendo 3,50 g a 4,00 g de solução de tampão fosfato a 0,1 M com pH 7,4. Após a homogeneização da fase oleosa, a fase aquosa foi vertida por meio de uma bureta com taxa de vazão de ~4 mL/min e a agitação continuou com FCR de 72 g, por mais 60 minutos. Ao término da agitação constante totalizando 90 minutos (30 minutos na fase oleosa + 60 minutos da fase oleosa com a fase aquosa), 1 mL de cada nanoemulsão produzida foi separada em tubos de microcentrífuga e colocados em centrifugação por 30 minutos a 1210 g para verificar a estabilidade a partir da observação de separação de fases.

[0045] Após 24 horas da produção das nanoemulsões, foram avaliados: tamanho médio das vesículas (nm), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (mV) das vesículas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons padrão (PCS) fixado 90° a 25 °C utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). As amostras foram previamente diluídas com água ultrapura tipo 1 na proporção de 1:100 (água: emulsão), e as medidas foram realizadas em triplicatas a 25 °C.

[0046] Aplicando as metodologias descritas anteriormente foram realizadas seis formulações diferentes que variaram o peso (g) da fase oleosa - fase aquosa: 1,1 g - 3,9 g; 1,15 g - 3,85 g; 1,20 g - 3,80 g; 1,25 g - 3,75 g; 1,30 g - 3,70 g e 1,35 g - 3,65 g. Os resultados obtidos, respectivamente para tamanho médio (nm): $157,50 \pm 3,905$; 137,20

$\pm 2,100$; $154,80 \pm 3,400$; $57,78 \pm 0,853$; $53,04 \pm 0,457$ e $51,54 \pm 2,011$; índice de polidispersão (PDI): 0,476; 0,552; 0,322; 0,978; 0,911 e 0,965 e potencial zeta (mV): -26,4; -21,3; -33,8; -26,8; -22,5 e -23,2. Em relação ao teste de separação de fases por centrifugação, não foi observado em nenhuma a separação de fases mostrando que as mesmas são homogêneas.

[0047] De acordo com os resultados apresentados, as emulsões formuladas foram caracterizadas como nanoemulsões devido ao tamanho médio das vesículas ser inferior à 200 nm. O Índice de Polidispersão (PDI) possui relação direta com a homogeneidade dos tamanhos das vesículas e seus valores quanto mais próximo de 1 indicam uma maior diferença entre os tamanhos das vesículas, desta forma é preferível que o PDI seja menor que 0,7, preferivelmente, valores próximos à 0,3 representam uma emulsão com vesículas mais homogêneas (CADDEO et al. *Int. J. Pharm.*, v. 363, n. 1-2, p. 183-191, 2008). Em relação aos resultados do PDI, a formulação que apresentou o valor mais próximo ao de 0,3 foi a formulação com o peso da fase oleosa de 1,20 g e fase aquosa de 3,80 g. O potencial zeta (ζ) é o potencial elétrico, definido como a distância da superfície da vesícula abaixo da qual os íons permanecem fortemente ligados à vesícula quando ela se move em um campo elétrico, preferivelmente os valores de ζ devem ser mais distantes de zero, tanto negativo ou positivo. Diante disso, todos os valores de ζ foram negativos e na mesma ordem de grandeza (-21,3 a -26,8 mV), exceto a formulação com fase oleosa de 1,20 g e fase aquosa de 3,80 g (-33,8 mV). Esses valores de ζ indicam uma maior magnitude de interação das forças de repulsão entre as vesículas, garantindo sua estabilidade. Segundo os dados mostrados anteriormente, a formulação que apresentou melhores parâmetros para uso comercial foi a nanoemulsão formulada com o peso da fase oleosa de 1,20 g e fase aquosa de 3,80 g que correspondeu ao menor PDI (0,322), maior valor negativo de ζ (-33,8 mV) e com tamanho médio considerado nanoemulsão ($154,80 \pm 3,40$ nm).

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA” **caracterizado por** uma nanoemulsões óleo/água (O/A) com vesículas de tamanho inferiores a 200 nm formadas por uma fase oleosa homogeneizada sob agitação constante composta por óleo essencial rico em terpenos, polissorbato 80 e Levodopa combinada com inibidores da dopa-decarboxilase e uma fase aquosa composta por tampão fosfato com pH neutro que a posteriori foi suavemente incorporada à fase oleosa sob constante agitação, sendo esta nanoemulsão passível de ser incorporada em formas farmacêuticas comerciais e utilizada no tratamento de doenças neurodegenerativas.
2. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase oleosa compreender o óleo essencial de *Piper nigrum* (Pimenta negra).
3. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelos** inibidores da dopa-decarboxilase serem cloridrato de benserazida ou carbidopa.
4. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** nanoemulsões contendo óleo essencial associado à Levodopa poderem ser utilizados para o tratamento da Doença de Parkinson como um novo sistema de administração de fármaco.

RESUMO**“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA”**

A invenção pertence ao setor tecnológico de bionanotecnologia com destaque na utilização de técnicas de nanoemulsificação aplicadas à uma possível melhora das propriedades físico-químicas e fisiológicas da levodopa. Trata-se de um processo para produção de nanoemulsões O/A com vesículas de tamanho inferiores a 300 nm para encapsulação do fármaco Levodopa para melhoramento no tratamento da Doença de Parkinson, devido ao fato da Levodopa ser um fármaco com uma distribuição descontínua no organismo, tempo de meia-vida curta e baixa biodisponibilidade. A nanoemulsão é produzida pelo método de baixa energia a partir da emulsificação espontânea do óleo essencial de *Piper nigrum*, do surfactante polissorbato 80, da Levodopa combinada a inibidores da dopa-decarboxilase, na fase oleosa, e do tampão fosfato em pH neutro, como fase aquosa. Além disso, em sua fase oleosa devido a presença do óleo de *Piper nigrum* contém níveis de terpenos, compostos ativos que possuem atividade antioxidante que podem melhorar no tratamento da Doença de Parkinson.