



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

(21) BR 102020025513-4 A2



(22) Data do Depósito: 14/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 28/06/2022

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA

(51) Int. Cl.: A61K 36/23; A61K 36/752; A61K 36/67; A61K 9/107.

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

(72) Inventor(es): THAMIRIS PINHEIRO SANTOS; PAULO EDUARDO DA SILVA BASTOS; ANDRE LUCAS CORREA DE ANDRADE; AMANDA RODRIGUES DOS SANTOS; TIAGO QUEIROZ DA MOTA BITTENCOURT; CAROLINA ALVES DE ARAUJO; MARCILIO MARTINS DE MORAES; CLAUDIO AUGUSTO GOMES DA CAMARA; MARILIA RIBEIRO SALES CADENA; PABYTON GONCALVES CADENA.

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA. A presente invenção descreve um processo de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) contendo a associação de levotiroxina sódica e óleos essenciais, produzidas por um processo de emulsificação sob agitação, com a fase aquosa sendo vertida sob gotejamento na fase oleosa. Esta associação visa melhorar a eficácia do fármaco comercial uma vez que os óleos utilizados apresentam atividade antioxidante comprovadamente descrita. A invenção compreende a formulação de vesículas com tamanhos inferiores a 500 nm. Ainda, a esta nanoemulsão pode ser incorporada em formas farmacêuticas de uso comercial. O produto final a partir da nanoemulsão pode ser usado na terapêutica humana e animal.

“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”

Campo da invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um processo de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) produzidas por um processo de emulsificação sob agitação. As nanoemulsões são produzidas a partir de óleos essenciais, que contenham efeitos benéficos relatados na literatura para o tratamento de disfunções tireoidianas, sendo estes óleos presentes em sua fase orgânica, enquanto a levotiroxina é adicionada a fase aquosa. As fases são então estabilizadas pelo uso de surfactantes. O produto final contendo a nanoemulsão pode ser utilizado no tratamento do hipotireoidismo. Esta invenção se situa no campo da biotecnologia com ênfase em bionanotecnologia aplicada a saúde humana e animal.

Fundamentos da invenção

[002] A glândula tireoide é revestida por células epiteliais cuboides que secretam substâncias dentro dos folículos, que por sua vez são preenchidos por coloide. O coloide por sua vez é composto pela tireoglobulina, uma proteína produzida pelas células foliculares que apresenta cerca de 70 aminoácidos de tirosina, que é o principal substrato a se combinar com o iodo e formar os hormônios tireoidianos (HTs). A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos é regulada por um sistema de *feedback* negativo envolvendo o hipotálamo, a hipófise anterior e a glândula tireoide. O hipotálamo produz o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) que vai agir na hipófise anterior que por sua vez produz o hormônio estimulante da tireoide (TSH). O TSH então estimula a tireoide a produzir tiroxina (T_4) (GUYTON; HALL, *Tratado de fisiologia médica*, 931-943, 2017). A conversão de tiroxina (T_4) para triiodotironina (T_3), o hormônio biologicamente ativo, ocorre nos tecidos periféricos pela remoção enzimática de uma unidade de iodo do anel externo da T_4 , processo denominado desiodação. Sendo assim, faz-se necessário apresentar níveis intracelulares de T_3 adequados afim de garantir a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvo (POWER et al., *Comp.*

Biochem. Phys. C, 130: 447-459, 2001; NUNES, *Arquivos Brasileiros de Endocrinol. Metabol.*, 47(6): 639-643, 2003). Na existência de disfunção da glândula tireoide, pode ocorrer o fornecimento insuficiente ou excessivo de HTs para o corpo. O hipotireoidismo caracteriza-se como um estado clínico resultante da quantidade reduzida ou até mesmo ausência de hormônios tireoidianos circulantes para suprir a função normal do corpo, enquanto que o hipertireoidismo caracteriza-se pelo aumento dos hormônios tireoidianos circulantes devido ao aumento da função da glândula tireoide (OLIVEIRA; MALDONADO, *Interciência Soc.*, 3(2): 36-44, 2014).

[003] Após o diagnóstico de hipotireoidismo, a reposição de hormônio tireoidiano com levotiroxina sódica é o tratamento comumente utilizado pelos pacientes, e se não tratado pode levar a uma série de complicações, inclusive a morte, sendo então necessário o tratamento por toda a vida do indivíduo, exceto em caso de hipotireoidismo transitório. O nome químico da levotiroxina sódica é (2S) -2-amino-3-[4- (4-hidroxi-3,5-diiodofenoxi) -3,5-diiodofenil] propanoato de sódio, que é o sal de sódio da levotiroxina, um levoisômero sintético da tiroxina (T₄) que é semelhante ao hormônio endógeno produzido pela glândula tireoide. Nos tecidos periféricos, a levotiroxina é desiodada pela 5'-desiodinase para formar a triiodotironina (T₃). As formulações orais de L-T₄ comercialmente disponíveis podem compreender comprimidos, cápsulas de gelatina mole e solução oral (GERONIMO et al., *Braz. J. Surg. Clin. Res.*, 23(2): 128-134, 2018). O Brasil em 2018 movimentou o mercado farmacêutico com vendas de levotiroxina sódica obtendo assim a posição de 14º medicamento mais comercializado no país de acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1-41, Brasília, 2019).

[004] A indicação e dosagem de L-T₄ descrita na literatura depende de fatores como gênero e idade do paciente, por exemplo. No caso de pacientes com idade inferior a 50 anos a indicação é de 1,7 µg/kg/dia, o que equivale a 100/150 µg/dia. Já para pacientes idosos ou cardiopatas as doses devem ser menores e respeitando intervalos de 4 a 6 semanas. Enquanto para recém-nascidos, lactantes e adolescentes, as doses devem ser superiores a 1,7 µg/kg/dia (COLUCCI et al., *EAAP endocrinol.*, 9(1): 40-47, 2013). Adicionalmente, alguns pacientes podem necessitar de doses mais altas ou mais baixas do que as geralmente utilizadas, devido às variações individuais na

absorção e muitas outras condições associadas que possam alterar as necessidades de L-T₄, como no caso dos portadores de doenças gastrintestinais, os usuários de suplementos dietéticos (VINAGRE E SOUZA, *Rev. Bras. Ter. Intens.*, 23(2): 242-248, 2011) e alguns fármacos que podem interferir com a absorção de L-T₄, tais como os anticoagulantes orais, antidiabéticos orais como insulina, indutores enzimáticos, amiodarona, glicocorticoides, inibidores de protease, inibidores da tirosina quinase, salicilatos e estrógenos, furosemida, bem como inibidores da bomba de prótons e modificadores da motilidade intestinal (GERONIMO et al., *Braz. J. Surg. Clin. Res.*, 23(2): 128-134, 2018). Ainda, outros fatores que também devem ser considerados incluem aqueles produtos usados contra disfunção na absorção, alimentação e gestação (BALOCH et al., *Thyroid*, 13(1): 3, 2003).

[005] A L-T₄ quando administrada por via oral é absorvida pela mucosa intestinal, especificamente no jejuno e íleo. A absorção é variável, girando em torno de 60% a 82% das doses durante as 3 horas após a administração do medicamento (SKELIN et al., *Clin. Ther.*, 39(2): 378-403, 2017). A sua meia-vida no plasma normal é de 5 a 7 dias (GOODMAN; GILMAN, *As bases farmacológicas da terapêutica*, 1175-1199, 2003), sendo aumentada nos casos de hipotireoidismo não tratado (HAYS; NIELSEN, *Thyroid*, (4):1, 1994). Na faixa de 80% da dose de levotiroxina ingerida é absorvida no trato gastrointestinal (MANDEL et al., *Ann. Intern. Med.*, 119, 1993) e seu pico de absorção é dado após 120 minutos da sua ingestão (JOHN-KALARICKAL et al., *Thyroid*, 17(8), 2007). No entanto, uma proporção substancial de pacientes tratados com levotiroxina têm apresentado sintomas persistentes, como depressão e bem-estar mental prejudicado, o que levou à questão se o tratamento com esse hormônio sintético é suficiente para todos os pacientes ou se terapias alternativas podem ser adotadas (CHACKER et al., *Lancet*, 390: 1550-15562, 2017).

[006] As doenças da tireoide podem se manifestar com sintomas evidentes ou de forma insidiosa. Em adultos diagnosticados com hipotireoidismo alguns sintomas como fadiga, letargia, intolerância ao frio, ganho de peso, constipação, alteração da voz e pele seca são comuns (CHACKER et al., *Lancet*, 390: 1550-1562, 2017). No hipotireoidismo ocorre produção acelerada de radicais livres (CHAKRABARTI et al., *Indian J. Endocrinol Metabol.*, 20: 674-678, 2016) e baixa disponibilidade de

antioxidantes (MANCINI et al. *Mediat. Inflamm.*, 2016: 1-12, 2016), que são as substâncias capazes de eliminar os radicais livres. Em consequência a esta condição biológica de desequilíbrio entre os radicais livres e a defesa antioxidante, decorre o aparecimento do estresse oxidativo que está implicado como um mecanismo fisiopatológico de diferentes doenças (MANCINI et al. *Mediat. Inflamm.*, 2016: 1-12, 2016).

[007] Métodos de detecção de sequestradores de radicais livres são utilizados para a identificação e quantificação de atividades antioxidante, como o 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (LUZIA et al., *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 69(2): 175-80, 2010). O DPPH é um radical livre, estável à temperatura ambiente, e a análise da atividade antioxidante por este método apresenta vantagens como a realização do teste em curto período de tempo, e por isso é comumente utilizado (ZOLA, Dissertação, 2014). Este radical apresenta coloração violeta, e é reduzido na presença de uma molécula de antioxidante doador de hidrogênio (LUZIA et al., *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 69(2): 175-80, 2010). O ABTS é um dos testes mais rápidos de ser realizado para análise da atividade antioxidante, apresentando outras vantagens como poder ser utilizado para amostras hidrossolúveis e lipossolúveis. O método é baseado na capacidade dos antioxidantes capturarem ABTS +, e o radical apresenta coloração azul esverdeado (ZOLA, Dissertação, 2014).

[008] Na literatura são relatados óleos essenciais com a proposta de serem ricos em antioxidantes, como *Cymbopogon citratus* (GUIMARÃES et al., *Ciênc. Agron.*, 42(2): 464-472, 2011), *Rhodostemonodaphne parvifolia* (ALCÂNTARA et al., *Acta Amazon.*, 40(3): 567 - 572, 2010), *Schinus terebinthifolius* (VELÁZQUEZ et al., *Fitoterapia*, 74: 91-97, 2003), *Citrus sinensis* (SINGH et al., *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1734-1740, 2010) e *Piper aduncum* (POHLIT et al., *Revista Fitos*, 2(1): 7-18, 2006). Todavia, até o presente momento, não foram localizados trabalhos que associassem esses óleos essenciais ao medicamento comumente prescrito para tratamento de disfunção tireoidiana.

[009] Os Óleos Essenciais (OEs) são líquidos voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com sua síntese podendo ser feita em diversos órgãos das plantas como flores, folhas e cascas (BILIA et al., *Evid-Based Compl. Alt.*, 2014: 1-14,

014). São misturas complexas compreendendo constituintes como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (BORN et al., *Exp. Appl. Acarol.*, 75: 491-502, 2018). Diversos são os métodos para extração de OEs, a exemplo da hidrodestilação, que consiste em colocar a planta em contato com a água fervente, podendo ela estar completamente imersa ou apenas flutuando (BUSATO et al., *Ciênc. Rural*, 44(9): 1574-1582, 2014). O produto final da extração pode variar, a depender da espécie da planta, tanto em qualidade e quantidade, como na própria composição. Isto se deve a fatores como clima, composição do solo, órgão da planta a qual é destinado a extração, idade e estágio do ciclo vegetativo da espécie (BILIA et al., *Evid-Based. Compl. Alt.*, 2014: 1-14, 014).

[0010] As NEs, também conhecidas como emulsões submicrônicas e miniemulsões, consistem em um tipo de sistema coloidal, sendo produzidas a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis (geralmente utiliza-se óleo e água), estabilizados através da adição de um surfactante apropriado para os compostos utilizados, que vai atuar diminuindo a tensão superficial entre os líquidos imiscíveis.

[0011] Uma NE pode conter vesículas pequenas com até 500 nm de tamanho (SINGH et al., *J. Control. Release*, 252: 28-49, 2017). O tamanho pequeno lhe confere tendência a serem transparentes ou apenas turvas, além de uma estabilidade melhor (MCCLEMENTS, *Soft Matter*, 7(6): 2297-2316, 2011).

[0012] O grau de estabilidade das nanoemulsões produzidas é determinado a partir de características físico-químicas como Tamanho, Carga (Potencial Zeta) e Índice de polidispersão das vesículas. Quanto ao tamanho da vesícula, durante a formulação, o tempo de homogeneização bem como a intensidade vão interferir gradativamente no tamanho das vesículas, podendo esta característica interferir no mecanismo de atuação da nanoemulsão. Quanto a carga, devido as emulsões serem sistemas que possuem tensoativos carregados em sua composição (surfactantes que geralmente são Tween e/ou Span), as partículas ganham carga positiva ou negativa, a depender do tipo de tensoativo e da proporção utilizada em sua composição, o que pode fazer com que as vesículas presentes na nanoemulsão se agreguem caso possuam carga próxima de zero (BILIA et al., *Evid-Based. Compl. Alt.*, 2014: 1-15, 2014; MCCLEMENTS, *Soft Matter*, 7(6): 2297-2316, 2011).

[0013] Os sistemas nanotecnológicos possuem diversas vias de administração, sendo as principais a administração tópica, oral e respiratória. O epitélio do trato intestinal é o mais importante para absorção de macro e micromoléculas, se tornando o mais utilizado para a absorção destes sistemas nanotecnológicos (HOET et al., *J. Nanobiotechnol.*, 2: 1-15, 2004).

[0014] Diante disso, o presente pedido de patente de invenção propõe uma nanoemulsão contendo a associação de levotiroxina sódica a óleos essenciais que apresentem atividade antioxidante, uma vez que estes por sua vez apresentam a capacidade de neutralizar, retardando ou inibindo, efeitos deletérios provocados por radicais livres em pacientes diagnosticados com hipotireoidismo. Logo, esse sistema nanotecnológico proposto se mostra um método mais eficiente para aumentar a eficácia terapêutica do fármaco.

[0015] Alguns documentos utilizando óleos essenciais para a formulação de nanopartículas ou nanoemulsões também são encontrados na literatura. Todavia, eles estão associados ao tratamento e/ou prevenção de outras enfermidades humanas que não seja o hipotireoidismo. Como o documento US 9492398 B2 que descreve a nanoencapsulação de óleos essenciais ou seu extrato com atividade antibacteriana de amplo espectro, atividade antiparasitária, atividade antifúngica, e/ou atividade antipatogênica. O extrato é encapsulado em nanopartículas ou nanocápsulas lipídicas obtidas por um método de temperatura de inversão de fase. A nanocápsula lipídica compreende uma mistura de lecitina de soja e uma mistura de polietilenoglicol livre 660 e 66-hidroxiestearato de polietilenoglicol. Ainda existe um veículo farmaceuticamente aceitável que é solução salina ou solução salina tamponada. O documento difere da presente invenção por não propor uma nanoemulsão a base de óleo essencial associado a levotiroxina.

[0016] No que se refere ao uso de derivados dos hormônios tireoidianos associado a óleos essenciais na preparação de fármacos, o documento EP 2941272 A1 descreve uma composição farmacêutica compreendendo levotiroxina, acácia e um antioxidante selecionado de galato de propila, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado. Adicionalmente contém sacarose, celulose microcristalina e manitol. A composição farmacêutica tem uma vida útil melhorada para tratar distúrbios da tireoide por

administração oral da composição ao paciente. O documento difere da presente invenção na sua composição, por não utilizar surfactante, e solução tampão, bem como por não se caracterizar como um sistema nanotecnológico.

[0017] Ainda, referente a utilização de derivados dos hormônios tireoidianos na preparação de fármacos, sem a associação a óleos essenciais, alguns documentos são encontrados na literatura. O documento US 9168239 B2 descreve uma substância de composição sólida, a qual é formada por um método que inclui a combinação de um solvente, levotiroxina sódica, manitol e fosfato de sódio dibásico para formar uma mistura líquida e a liofilização dessa mistura. Difere da presente invenção em sua composição por não apresentar óleo essencial, e também por não se tratar de um sistema nanotecnológico.

[0018] Documentos como US 7723390 B2, US 9682045 B2, US 005753254 A, US 006936274 B2, WO 158463 A1, CA 2333193 A1, US 5225204 A, US 5635209 A, US 5753254 A, US 6936274 B2 diferenciam-se da presente invenção por não conter a associação de levotiroxina sódica com um óleo essencial para formar uma nanoemulsão.

[0019] Também, pode ser encontrado na literatura documentos como o US 0178870 A1 que descreve um dispositivo inalador compreendendo uma mistura estável de pó seco estável do hormônio da tireoide. De acordo com a invenção, o referido dispositivo contém uma mistura compreendendo hidrato de levotiroxina sódica, partículas de lactose, gelatina, amido de milho, glicolato de amido sódico, estearato de magnésio e talco silicificado. Este documento difere da presente invenção em seu processo, composição e via de administração do produto já que não apresenta óleo essencial e não se trata de um sistema nanotecnológico.

[0020] Diante do exposto, não foram encontradas informações no estado da técnica que divulguem os elementos contidos na presente invenção comprovando sua novidade. O estado da técnica também demonstra o espaço para a proposição de um novo processo de obtenção de produto a base de um sistema nanotecnológico, possuindo uma fase orgânica a base de óleo essencial e uma fase aquosa contendo levotiroxina sódica que se associam e podem potencializar o efeito terapêutico.

Descrição da invenção

[0021] Para fins desta invenção, o material para a composição da fase orgânica foi óleos essenciais, que são substâncias voláteis que possuem vários compostos, dentre eles terpenos, cetonas, álcoois, fenilpropanóides (EDRIS, *Phytother. Res.*, 21: 308-323, 2007).

[0022] Para fins desta invenção, o tampão fosfato de sódio ou tampão fosfato salino podem ser utilizados preferencialmente como meio para a solubilização do fármaco levotiroxina, uma vez que este é hidrofílico.

[0023] A nanoemulsão foi preparada a partir de duas fases: i. Fase aquosa composta de tampão, preferencialmente com pH ajustado entre 6,5 e 7,4 a molaridade de 0,1 M, e levotiroxina sódica; ii. Fase oleosa composta por óleo essencial preferencialmente *Carum carvi*, *Citrus sinensis* ou *Piper aduncum*, por serem descritos na literatura por apresentarem eficácia no tratamento do hipotireoidismo e/ou serem ricos em antioxidantes (KHAN et al. *EAAP J. Pharm. Med. Res.*, 3(6), 231-236, 2016; SINGH et al. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1734-1740, 2010; POHLIT et al. *Fitos*, 2(1): 7-18, 2006), e Monooleato de sorbitano (Tween 80®) e/ou Polissorbato 80 (Span 80®) de 0 a 20% (p/p) submetida a suave agitação.

[0024] Para a formação da nanoemulsão, as fases oleosa e aquosa foram preparadas separadamente. Inicialmente a fase oleosa foi produzida sob agitação constante, por preferencialmente 30 minutos, a partir de óleo essencial e polissorbitano 80 (Tween 80®) e/ou monooleato de sorbitano 80 (Span 80®) nas concentrações preferenciais de 5% a 20%. Esta fase foi homogeneizada sob agitação controlada e constante, preferencialmente 635 g. Em simultaneidade, a fase aquosa foi produzida a partir da levotiroxina sódica e diluída em 43,75 mL de tampão fosfato.

[0025] Após finalizada a homogeneização, 4 g da fase aquosa foi vertida sob gotejamento, em uma taxa de fluxo de aproximadamente 3,5 mL/min, a fase oleosa ainda sob agitação. Em seguida, esta mistura foi mantida em agitação vigorosa, controlada e constante para formação da nanoemulsão óleo/água (O/A) durante preferencialmente 1 hora.

[0026] Por fim, para que seja possível a comercialização, o complexo final pode ser misturado com excipientes farmacologicamente aceitáveis, como o estearato de magnésio e outros adjuvantes, bem como crioprotetores como glicose, sacarose, manitol e povidona, para compressão em comprimidos ou colocados em cápsulas.

[0027] A nanoemulsão foi caracterizada conforme descrito nos exemplos a seguir:

Exemplo 1: Produção de uma nanoemulsão O/A contendo levotiroxina e óleos essenciais em escala de bancada

[0028] As nanoemulsões foram produzidas para um volume final de 5,00 g contendo duas soluções. Primeiramente a solução 1, que compreende a fase oleosa foi preparada contendo óleo essencial e polissorbato (Tween 80®) e monooleato de sorbitano 80 (Span 80®), e agitada por 30 minutos em suave agitação constante de 900 rpm em agitador magnético. Em seguida, a solução 2, que compreende a fase aquosa, contendo tampão fosfato com pH regulado para 7,4 e levotiroxina sódica diluída. A levotiroxina pode preferencialmente ser 1 comprimido macerado, sendo a quantidade total na formulação dependente da dosagem do comprimido utilizado. A dose exata do comprimido de levotiroxina sódica utilizada dependerá da finalidade do tratamento e será verificada por um especialista na técnica. Passados os 30 minutos, a solução 2 foi vertida na solução 1 por gotejamento utilizando bureta a uma taxa de fluxo de 3,5 mL/min. Após a solução aquosa ser completamente vertida, a agitação foi mantida por 60 minutos a 900 rpm. Os óleos essenciais de *Citrus sinensis* (CS) e *Piper aduncum* (PA) foram isolados separadamente das folhas frescas, enquanto o de *Schinus terebinthifolius* (ST) foi isolado dos frutos, usando um aparelho do tipo Clevenger modificado e hidrodestilação. Esses óleos foram caracterizados por Cromatografia Gasosa do tipo FID (500 GC, PerkinElmer Clarus, Shelton, CO, EUA) e MS (220-MS IT GC, Varian, Walnut Creek, CA, EUA). Enquanto o óleo essencial de *Carum carvi* (CC) foi adquirido em comércio. Quanto a composição dos óleos, o de *Citrus sinensis* apresentou os seguintes componentes: 1,25% α -Pineno, 1,87% β -Pineno, 90,13% Limoneno. O óleo essencial de *Piper aduncum* apresentou os principais componentes: 1,01% (E)- β -Ocimeno, 1,83% α -Terpineol, 3,20% β -Cariofileno, 8,32% α -Humuleno, 1,93% γ -Himachaleno, 1,34% Germacreno B, e 78,41% Dilapiol. O óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* apresentou os principais

componentes: 7,18% iso-Silvestreno, 1,90% o-Cimeno, 1,02% Limoneno, 2,84% (E)- β -Ocimeno, 1,50% Terpinen-4-ol, 1,29% (E)-Isocitral, 1,50% δ -Elemeno, 1,66% α -Copaeno, 3,42% iso-longipineno, 3,04% Longipineno, 1,00% β -funebreno, 16,18% β -Cariofileno, 1,51% β -lilangeno, 2,66% β -Copaeno, 1,91% β -Gurjuneno, 2,63% γ -Elemeno, 15,99% Aromadendreno, 1,87% 9-epi-(E)-Cariofileno, 1,3% γ -Gurjuneno, 2,25% α -Amorfenol, 1,14% linalenceno, 8,54% Bicyclogermacreno, 1,71% β -Himachaleno, 1,64% Germacreno A, 1,75% Germacreno B. *Carum carvi* apresenta os principais componentes: 2,14% p-Cimeno, 34,14% Limoneno, 1,19% Dill etér, 60,44% Carvona.

Exemplo 2: Efeito da concentração de óleos essenciais, surfactantes e tampão fosfato contendo levotiroxina sob a preparação da emulsão

[0029] Para a determinação da proporção final de óleo essencial, tampão fosfato contendo levotiroxina a 4 $\mu\text{g/mL}$, e surfactantes (tween 80 e span 80) na preparação da emulsão foram utilizadas 4 diferentes concentrações destes compostos como demonstrado na tabela a seguir.

[0030] Tabela 1. Diferentes proporções dos componentes na preparação da emulsão.

Óleo	Amostra	Velocidade de agitação	Tempo de agitação	Óleo (p/p)	Tween® 80 (p/p)	Span® 80 (p/p)	Solução Tampão + L-T ₄	Total % (p/p)
<i>Carum carvi</i>	CC1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%
	CC2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	CC3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	CC4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%
<i>Citrus sinensis</i>	CS1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%
	CS2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	CS3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	CS4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%
	PA1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%

<i>Piper aduncum</i>	PA2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	PA3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	PA4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%
<i>Schinus terebinthfolius</i>	ST1	900 rpm	60 min	10%	20%	0%	70%	100%
	ST2	900 rpm	60 min	20%	20%	0%	60%	100%
	ST3	900 rpm	60 min	10%	5%	5%	80%	100%
	ST4	900 rpm	60 min	10%	10%	10%	70%	100%

Exemplo 3: Determinação da estabilidade de acordo com a separação de fases

[0031] As emulsões após serem preparadas, foram colocadas em um frasco respeitando o *head space* com aproximadamente um terço da capacidade do frasco, e colocadas em centrífuga a 1210 *g* (3000 rpm) durante 30 minutos para análise da separação de fases. Após isso, foram retiradas do equipamento e mantidas em bancada até temperatura ambiente para observar a separação de fases como um indicativo de estabilidade. No estudo, foi possível observar que dos 4 óleos essenciais utilizados para a formulação das emulsões, o de *Schinus terebinthfolius* separou fases em todas as combinações, enquanto que nos demais óleos essenciais não houve separação de fases.

Exemplo 4: Avaliação das características organolépticas

[0032] Após avaliação da separação de fases, foi realizada a análise das características organolépticas (avaliação macroscópica) de todas as emulsões, exceto as de *Schinus terebinthfolius* devido a separação de fases de todas as amostras. Esta etapa consistiu em uma análise física macroscópica a fim de determinar as melhores emulsões estabilizadas quanto a Aspecto, Cor e Odor de acordo com o protocolo da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004). Para aspecto foi analisado Fase de dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT);

Consistência: Fluido (FL), Pouco espesso (PE), Espesso (E) ou Muito espesso (ME); Opacidade: Translúcido (TR), Pouco Opaco (PO) ou Opaco (O); e Grumos: Presença (PR) ou Ausente (AU). Para Odor E Cor foi analisado Presença (PR) ou Ausência (AU) que quando presente foi classificado em Modificado (MO), levemente modificado (LM) ou Sem alteração (SA) em relação ao óleo.

[0033] De acordo com a observação macroscópica foi possível observar que todas as formulações se mostraram homogêneas. Também foi observado que todas as formulações apresentaram consistência fluída, exceto a CC4 e PA4 que se mostraram pouca espessas. Ainda, quanto a opacidade, apenas as amostras CC1 e CS2 se mantiveram translúcidas. Apenas a amostra CS3 apresentou grumos em sua composição. O odor esteve presente em todas as amostras, visto que os óleos essenciais apresentam aromas variados, porém nas amostras PA1 e PA3 o odor foi modificado. A cor, também presente em todas as amostras, foi modificada em todas elas sendo levemente modificada em CS1 apenas.

[0034] De acordo com os dados obtidos, as melhores emulsões foram: *Carum carvi* (CC1) com 0,5 g de óleo, 1,0 g de tween 80 e 3,5 de solução tampão + L-T₄, por se apresentar homogênea, fluída, translúcida e sem modificação de odor; *Citrus sinensis* (CS2) com 0,5 g de óleo, 1,0 g de tween 80 e 3,5 de solução tampão + L-T₄, por se apresentar homogênea, fluída, translúcida e sem modificação de odor; e *Piper aduncum* (PA4) com 0,5 g de óleo, 0,5 g de tween 80, 0,5 de span 80, e 3,5 de solução tampão + L-T₄ por se apresentar homogênea, fluída, pouco opaca e sem alteração de odor.

Exemplo 5: Efeito das variáveis físicas de tempo e velocidade de agitação no Tamanho, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta das emulsões

[0035] De acordo com os resultados obtidos no Exemplo 4, apenas as emulsões que apresentaram as melhores características organolépticas (análise macroscópica) seguiram para elaboração do planejamento fatorial de dois níveis (3×2^2), com o objetivo de analisar o efeito das variáveis Tempo e Velocidade de agitação na formação das vesículas.

[0036] Na variável Tempo foi utilizado 1 hora, 1 hora e 30 minutos, e 2 horas. Enquanto na variável Velocidade de agitação utilizamos 282 g, 635 g e 1129 g. As nanoemulsões foram diluídas em água ultrapura para então serem submetidas a análise, reduzindo assim a sua turbidez. Foram avaliados o tamanho médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das vesículas de óleo pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons padrão (PCS) fixado 90° a 25 °C utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) (CADENA et al., BBA, 1828:309-316, 2013; RIQUELME et al., Food Sci, Technol., 111: 760-766, 2019).

[0037] As análises foram realizadas por 4 repetições e mais 3 pontos centrais para cada amostra, de acordo com o planejamento fatorial, e os resultados obtidos foram: Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Carum carvi* variaram de 218,5 a 408,6 para tamanho médio (nm), de 0,257 a 0,409 para PDI e de -12,5 a -22,7 para potencial zeta. Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Citrus sinensis* variaram de 200,2 a 401,9 para tamanho médio, de 0,113 a 0,460 para PDI, e de -12,9 a 21,3 de potencial zeta. Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Piper aduncum* variaram de 326,9 a 631,3 para tamanho médio, de 0,113 a 0,460 para PDI, e de -30,6 a 39,1 para potencial zeta.

[0038] Diante dessas informações, as emulsões produzidas se caracterizam como nanoemulsões, uma vez que os tamanhos de suas vesículas foram inferiores a 500 nm (SINGH et al., *J. Control. Release*, 252: 28-49, 2017), exceto em amostras contendo o óleo essencial de *Piper aduncum*. Adicionalmente, para o índice de polidispersão (PDI), uma medida que caracteriza a homogeneidade do tamanho das vesículas, é preferível que os valores estejam abaixo de 0,7. Estando os valores próximos a 0,3 é indicativo de boa homogeneidade (CADDEO et al. *Int. J. Pharm.*, 363(1-2), 183-191, 2008). Valores próximos a 0,3 foram obtidos em todas as nanoemulsões. Em relação ao potencial zeta (ζ - mv), todas as nanoemulsões apresentaram o potencial negativo, com valores próximos a -20 mV. Ainda, apenas as nanoemulsões de *Piper aduncum* apresentaram valores próximos a -30 mV. Torna-se importante destacar que em nenhuma formulação houve o acréscimo de agentes de carga, visando assim simplificar o processo de produção. Baseado nas informações acima, consideramos que nanoemulsões com menor Tamanho, menor PDI e maior Potencial Zeta foram as mais eficientes para a atual proposta, e que passarão para a etapa de avaliação da

atividade antioxidante. Desta forma, para a nanoemulsão de *Carum carvi* a amostra 2 foi selecionada, para *Citrus sinensis* foi escolhida a amostra 5, e para *Piper aduncum* a amostra 11.

Exemplo 6: Teste de Estabilidade Preliminar – Características Organolépticas

[0039] O teste de estabilidade preliminar consiste em submeter as formulações a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade baseando-se nos protocolos da ANVISA adaptados (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004). As amostras foram preparadas e armazenadas em recipientes fechados com tampa de boa vedação, contendo um *head space* equivalente a um terço da capacidade total do recipiente, afim de permitir possíveis trocas gasosas. As nanoemulsões utilizadas foram as mesmas preparadas para a análise do efeito das variáveis físicas de tempo e velocidade de agitação do exemplo 5. Essas amostras foram submetidas a estudos de aquecimento, resfriamento e congelamento durante 24 horas. Todas as nanoemulsões foram observadas e comparadas por suas características organolépticas após serem retiradas dos equipamentos e chegarem à temperatura ambiente. Os dados destas análises são observados na tabela a seguir.

[0040] Tabela 4. Aspectos organolépticos decorrentes dos diferentes estresses térmicos provocados nas nanoemulsões.

Centrifugação 1210 g /30 min						
Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HM	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HM	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CC4	HM	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
CC5	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS1	HT	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CS2	HT	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
CS3	HT	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS4	HT	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO

CS5	HT	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA1	HM	FL	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA2	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA3	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA4	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA5	HT	FL	O	AU	PR/SA	PR/MO

Resfriamento 5 ± 2 °C

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	PO	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CC5	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CS1	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CS2	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
CS3	HT	FL	PO	AU	PR/MO	PR/MO
CS4	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CS5	HT	FL	PO	AU	PR/LM	PR/MO
PA1	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA2	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA3	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA4	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO

Congelamento -20 ± 2 °C

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	LO	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HT	FL	LO	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	LO	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HT	FL	LO	AU	PR/SA	PR/MO
CC5	HT	FL	LO	AU	PR/LM	PR/MO
CS1	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS2	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS3	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO

CS4	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
CS5	HM	FL	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA1	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA2	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA3	HM	E	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA4	HM	PE	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO

Aquecimento 37 ± 2 °C

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC5	HM	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CS1	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS2	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS4	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS5	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
PA1	HM	PE	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA2	HM	E	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA3	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA4	HM	E	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO

Aquecimento 40 ± 2 °C

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC5	HM	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CS1	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA

CS3	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS4	HM	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS5	HM	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
PA1	HM	PE	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA2	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA3	HM	PE	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA4	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA5	HM	PE	O	AU	PR/MO	PR/MO

Aquecimento 50 ± 2 °C

Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase de dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
CC1	HT	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CC2	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC4	HM	FL	TR	AU	PR/LM	PR/MO
CC5	HM	FL	TR	AU	PR/MO	PR/MO
CS1	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS2	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS3	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
CS4	HT	FL	TR	AU	PR/SA	PR/SA
CS5	HT	FL	TR	AU	PR/LM	PR/SA
PA1	HM	E	O	AU	PR/MO	PR/MO
PA2	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA3	HM	E	O	AU	PR/SA	PR/MO
PA4	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO
PA5	HM	E	O	AU	PR/LM	PR/MO

[0041] Após passagem por todas as etapas de estresse propostas pelo teste de estabilidade preliminar, os resultados foram apresentados conforme permanência da homogeneidade das amostras uma vez que essa seria a condição ideal de estabilidade para a nanoemulsão. Assim sendo, os nossos dados revelaram que para as nanoemulsões de *C. carvi*, a homogeneidade foi observada em todas as amostras após a centrifugação, e nas amostras 2, 4 e 5, nas 3 diferentes temperaturas de aquecimento (37, 40 e 50 °C). Para as nanoemulsões de *C. sinensis*, a homogeneidade foi observada em todas as amostras após congelamento e aquecimento a 40 °C. Por fim, para as nanoemulsões de *P. aduncum*, a

homogeneidade foi observada na amostra 1 após centrifugação, e em todas as amostras após resfriamento, congelamento, e nas 3 diferentes temperaturas de aquecimento (37, 40 e 50 °C). Acrescentamos ainda que todas as nanoemulsões não apresentaram grumos em condição de estresse. Apenas nanoemulsões contendo óleo essencial de *P. aduncum* apresentaram consistência variando de pouco espessa para espessa nas condições de estresse, exceto na centrifugação, bem como apresentaram opacidade em todas as condições.

Exemplo 7: Análise da atividade antioxidante das nanoemulsões

[0042] Para esta análise foram utilizadas as nanoemulsões de *Carum carvi* contendo 0,5 g de óleo, 1,0 g de tween 80, 3,5 g de solução tampão contendo L-T₄ ; *Citrus sinensis* contendo 1,0 g de óleo, 1,0 g de tween 80, 3,0 g de solução tampão contendo L-T₄ ; *Piper aduncum* contendo 0,5 g de óleo, 0,5 g de tween 80, 0,5 g de span 80, 4,0 g de solução tampão contendo L-T₄ (as mesmas utilizadas no exemplo 5). A atividade sequestradora de radicais livre DPPH[•] e ABTS^{•+} das nanoemulsões foi realizada seguindo a metodologia de Silva et al. (2006) (SILVA et al. *J. Food Compost. Anal.*, 19, 507–511, 2006) e RE et al. (1999) (RE et al. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231–1237, 1999), respectivamente. As nanoemulsões após preparadas foram diluídas em etanol e testadas para os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, com as concentrações variando entre 0,5 a 500,0 µg/mL. Nos testes DPPH[•] e ABTS^{•+} as amostras foram protegidas da luz e sonicadas (Potência 40kHz). Para DPPH[•] a sonicação durou 30 min, enquanto para e ABTS^{•+} durou 6 min. A avaliação da atividade sequestradora de radicais livres nos testes DPPH[•] e ABTS^{•+}, foi realizada através da medida das absorbâncias das amostras e dos controles positivos em comprimentos de onda de 517 nm e 734 nm, respectivamente, em um dispositivo UV-vis (Biochrom EZ Read 2000). O ácido ascórbico e o Trolox foram usados como antioxidante de referência (controle positivo) e todas as concentrações foram testados em triplicata. A porcentagem de atividade de sequestro (% AS) tanto para DPPH[•] quanto para ABTS^{•+} foi calculada a partir da equação: $\%AS = 100 \times (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle}$. Onde $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle contendo apenas a solução de DPPH/ABTS^{•+} em etanol e $Abs_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença da amostra ou do ácido ascórbico/Trolox padrão. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida por análise de

regressão linear e o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos através do valor da Concentração Efetiva média (CE50), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais. Todas as nanoemulsões contendo óleos essenciais se mostraram ativas nos testes antioxidantes. No teste de DPPH o melhor resultado foi observado para a nanoemulsão contendo o óleo de *C. carvi* (CE50 = 204,3 µg/mL). Já no teste com o radical ABTS, a nanoemulsão contendo o óleo de *P. aduncum* (CE50 = 156,6 µg/mL) apresentou o melhor resultado. Esses resultados observados para as espécies *C. carvi* e *P. Aduncum* podem ser justificados pela presença de compostos oxigenados em suas composições. Com isso, é possível concluir que essas nanoemulsões apresentam atividade antioxidante.

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA” **caracterizado por** um método de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) possuindo tamanho inferior a 500 nm, onde a fase aquosa é composta por tampão fosfato na faixa neutra e levotiroxina sódica, sendo esta vertida suavemente na fase oleosa formada por óleos essenciais compreendendo *Carum carvi*, *Citrus sinensis* e *Piper aduncum*, ainda tendo na fase oleosa tensoativo que confere estabilidade compreendendo o monooleato de sorbitano 80 e o polisorbato 80, podendo estas nanoemulsões serem incorporadas em formulações farmacêuticas de uso comercial.
2. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase oleosa ser preparada pela adição do monooleato de sorbitano 80 e polisorbato 80 no óleo essencial sob suave agitação.
3. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase aquosa ser preparada pela adição de levotiroxina a um tampão fosfato na faixa neutra.

RESUMO**“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS ASSOCIADOS A LEVOTIROXINA”**

A presente invenção descreve um processo de obtenção de nanoemulsões óleo/água (O/A) contendo a associação de levotiroxina sódica e óleos essenciais, produzidas por um processo de emulsificação sob agitação, com a fase aquosa sendo vertida sob gotejamento na fase oleosa. Esta associação visa melhorar a eficácia do fármaco comercial uma vez que os óleos utilizados apresentam atividade antioxidante comprovadamente descrita. A invenção compreende a formulação de vesículas com tamanhos inferiores a 500 nm. Ainda, a esta nanoemulsão pode ser incorporada em formas farmacêuticas de uso comercial. O produto final a partir da nanoemulsão pode ser usado na terapêutica humana e animal.