

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual

Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
21 de Junho de 2018 (21.06.2018)



W I P O I P C T



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2018/109690 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes:

BOU 13/00 (2006.01) BOU 19/12 (2006.01)

A61K 9/S1 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional:

PCT/IB20 17/057900

(22) Data do Depósito Internacional:

13 de Dezembro de 2017 (13.12.2017)

(25) Língua de Depósito Internacional:

Português

(26) Língua de Publicação:

Português

(30) Dados Relativos à Prioridade:

109791 13 de Dezembro de 2016 (13.12.2016) PT

(71) Requerentes: UNIVERSIDADE DO PORTO [PT/PT];

Praça Gomes Teixeira, S/N, 4º, S. 463, 4099-002 Por-

to (PT). UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE [BR/BR]; Avenida Professor Moraes Rego N° 1.235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, (CEP)50670-901 Recife, Pernambuco (BR).

(72) Inventores: SOARES SOBRINHO, José Lamartine;

Rua Setúbal 1510, Apto 802, Boa Viagem, 51030-010 Recife-pe (BR). MELO TIBÚRCIO CAVALCANTI DUARTE COELHO, Suellen; Rua Governador Lopo Garro, 27, Engenho Do Meio, 50730-290 Recife - Pernambuco (BR).

DE FREITAS FERNANDES HIPÓLITO REIS DIAS RODRIGUES, Maria De La Salette; UciBio, Requite, Dep. Ciências Químicas Fac. Farmácia Da Uporto Rua De Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto (PT).

OLIVEIRA DE LACERDA NUNES PINHO, Cláudia Daniela; UciBio, Requite, Dep. Ciências Químicas Fac. Farmácia

(54) Title: PRODUCTION OF LIPID NANOPARTICLES BY MICROWAVE SYNTHESIS

(54) Título: PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS MEDIANTE SÍNTESE POR MICROONDAS

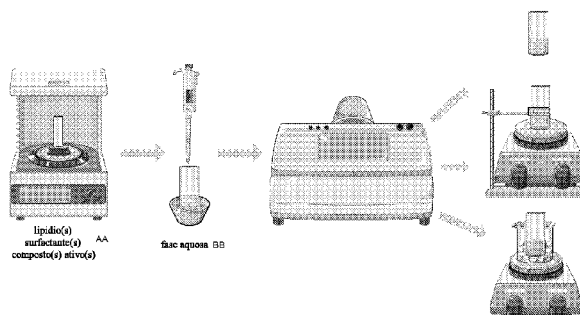


Figura 1A

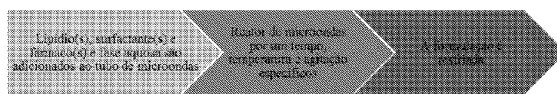


Figura 1B

AA lipid(s)
surfactant(s)
active compound(s)
BB aqueous phase
CC Lipid(s), surfactant(s) and drug(s) and aqueous phase are added to the microwave tube
DD Microwave reactor for a specific time, at a specific temperature and with specific stirring
EE The formulation is cooled

(57) Abstract: The present invention describes a simple, quick, economical and sustainable production process for producing lipid nanoparticles using a microwave reactor. The technology of the present invention allows one-pot production of said particles, in one or two steps and in a closed system. Said technology does not use organic solvents or large volumes of water. Said technology allows lipid nanoparticles to be produced for medicinal (therapeutic and/or diagnostic), cosmetic and nutritional purposes. By adjusting the main critical factors of the process, such as time, temperature and stirring efficiency (which are dependent on the dimensions of the magnetic bar, stirring speed and total volume of the formulation), it is possible to produce lipid nanoparticles with the intended features, such as: average size comprised between 30 and 900 nm, preferably between 60 and 300 nm; polydispersion between 0.05 and 0.5, preferably

(Continua na página seguinte)

Da Uporto Rua De Jorge, Viterbo Ferreira 228, 4050-3 13
Porto (PT).

(74) **Mandatário: PEREIRA DA CRUZ, João;** J.Pereira Da
Cruz, S.A., Rua Vitor Cordon, 14, 1249-103 Lisboa (PT).

(81) **Estados Designados** (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados** (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))
- antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))
- em preto e branco; o pedido internacional tal como depositado contém cores ou níveis de cinza e pode ser baixado no PATENTSCOPE

between 0.1 and 0.3; and modular zeta potential value between 10 and 50 mV, preferably between 20 and 40 mV.

(57) **Resumo:** A presente invenção descreve um processo produtivo simples, rápido, económico e sustentável de obtenção de nanopartículas lipídicas através de reator de microondas. A tecnologia da presente invenção permite o fabrico one-pot das referidas partículas, numa ou duas etapas, e sistema fechado. Não utiliza solventes orgânicos, nem grandes volumes de água. Permite a obtenção de nanopartículas lipídicas para fins medicinais (terapêutica e/ou diagnóstico), cosméticos e alimentícios. Através de ajustes nos principais fatores críticos do processo - como tempo, temperatura e eficiência de agitação (dependentes das dimensões da barra magnética, velocidade de agitação e volume total da formulação) - é possível obter nanopartículas lipídicas com as características pretendidas, como: tamanho médio compreendido entre 30 e 900 nm, preferencialmente entre 60 e 300 nm; polidispersão entre 0,05 e 0,5, preferencialmente entre 0,1 e 0,3; e o potencial zeta num valor modular entre 10 e 50 mV, preferencialmente entre 20 e 40 mV.

DESCRIÇÃO

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS MEDIANTE SÍNTESE POR MICROONDAS

Domínio da invenção

A presente invenção insere-se na área da nanotecnologia, especificamente na tecnologia de produção de nanopartículas lipídicas, para fins medicinais (terapêutica e/ou diagnóstico), cosméticos e alimentares. Diz respeito a um processo simples, rápido e económico de obtenção de nanopartículas lipídicas, através de um novo método de preparação por microondas.

Antecedentes da invenção

Nas últimas décadas, muitos sistemas coloidais têm sido desenvolvidos e estudados para melhorar a administração de fármacos, por forma a aumentar a entrega nos tecidos alvo e a diminuir os efeitos secundários. Estes veículos incluem micelas, nanoemulsões, nanosuspensões, nanopartículas poliméricas e lipossomas. Para a maioria desses transportadores, um método de produção de baixo custo em grande escala não existe. As nanopartículas lipídicas (LNPs) surgiram com o potencial de superar esta limitação, apresentando ainda outras vantagens.

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) surgiram no início dos anos 90 (H. Muller et al., 2011). Desde aí que vários grupos se dedicaram ao seu estudo e modificações com o intuito de melhorarem as suas propriedades a partir do conceito original, criando assim sistemas mais complexos, tais como os carregadores lipídicos nanoestruturados (NLC) e os conjugados lípido- fármaco (Kriti Soni, 2015). Todos eles se baseiam no uso de materiais lipídicos para formar um veículo transportador, o que se apresenta muito vantajoso sobre outros tipos de materiais. Todas as LNPs são geralmente compostas por uma matriz de lípidos fisiológicos ou fisiologicamente relacionados e caracterizados pela sua versatilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Das and Chaudhury, 2011, Battaglia and Gallarate, 2012, Pardeike et al., 2009). Os lípidos são materiais que podem ser degradados por processos naturais, tais como a atividade enzimática. Devido a estes processos, lípidos complexos são facilmente e completamente degradados no corpo humano. Por conseguinte, os excipientes que compõem a matriz de LNPs são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Severino et al., 2012, Pardeike et al., 2009). Os lípidos utilizados podem ser triglicéridos (exemplo: triestearina), glicéridos parciais (exemplo: Imwitor), ácidos gordos (exemplos: ácido esteárico e

ácido palmítico), esteroides (exemplo: colesterol) e ceras (exemplo: palmitato de cetilo) (Mukherjee et al., 2009). Vários agentes emulsionantes e suas combinações têm sido utilizados para estabilizar as dispersões de lípidos. As LNPS apresentam outras vantagens em circulação quando comparadas com outros sistemas de entrega de fármacos coloidais, incluindo a melhoria da estabilidade cinética, liberação de fármaco controlada, baixa toxicidade, elevada carga útil de fármaco e a capacidade de encapsular fármacos lipofílicos e hidrofílicos (Das and Chaudhury, 2011).

Atualmente, mais de 40 grupos de pesquisa em todo o mundo, trabalham de uma forma sistemática com LNPs, tendo sido publicados mais de 2000 artigos com arbitragem científica desde 1995. Isto prova o interesse crescente no campo das nanopartículas lipídicas. As LNPs têm sido investigadas para várias aplicações farmacêuticas e contemplando vários tipos de administração, como por exemplo: parentérica (Bondi et al., 2007, Brioschi et al., 2007, Wissing et al., 2004) (Blasi et al. 2007), perorai (Muller et al., 2006, Martins et al., 2007, Sarmento et al., 2007, Yuan et al., 2007), por via cutânea (Muller et al., 2002) (Priano et al. 2007), ocular (Attama and Muller-Goymann, 2008, Ugazio et al., 2002) e pulmonar (Xiang et al. 2007; Liu et al. 2008). Adicionalmente, e uma vez que têm sido bastante estudadas para aplicação dérmica, as nanopartículas lipídicas tornaram-se muito atrativas para a indústria cosmética (Pardeike et al., 2009).

Existem várias técnicas relatadas para a produção de nanopartículas lipídicas, cada qual com suas vantagens e desvantagens e por isso apropriadas a realidades distintas (Llner and Yener, 2007, Marcato, 2009). Em seguida são apresentadas de forma sucinta os métodos de preparação existentes:

Homogeneização a alta pressão a quente e a frio: Na homogeneização a alta pressão uma dispersão de partículas é impulsionada com alta pressão (100-2000 bar) através de uma cavidade estreita (poucos micrômetros), e acelerada numa curta distância, com alta velocidade (cerca de 100 km/h) ao encontro de uma barreira. A colisão com a barreira possibilita a formação de nanopartículas com reduzido diâmetro (Mehnert and Mäder, 2001). Desvantagens - homogeneização quente: Indução da degradação do fármaco pela temperatura; efeito de particionamento; complexidade da cristalização. Desvantagens - homogeneização fria: Tamanhos de partículas grandes e distribuição de tamanho mais amplo; não evita exposição térmica, mas minimiza.

Homogeneização de alto corte e ultrassonicação (High Shear Homogenization): Este método inclui a fusão dos lípidos e formação de uma emulsão recorrendo a ultra-turrax e/ou sonicação. Vários parâmetros influenciam o tamanho da partícula obtido, tais como o tempo de emulsificação, velocidade de agitação e de arrefecimento. Desvantagens: Potencial contaminação por metais; distribuição de tamanho de partícula mais amplo; instabilidade física como de crescimento das partículas sob armazenamento.

Técnica microemulsão: Preparação por agitação de uma mistura opticamente transparente a

65 - 70 °C, composta por: um ácido gordo de baixo ponto de fusão, emulsionante, co-emulsificante e água. Esta microemulsão quente é imediatamente dispersa em água fria (2-4 °C) sob agitação. Desvantagens: Necessidade de remoção do excesso de água (por ultracentrifugação, liofilização ou diálise); uso de altas concentrações de surfactantes e co-surfactantes.

Técnica microemulsão assistida por microondas: Similar à técnica convencional de microemulsão. A diferença é que a etapa de aquecimento é realizada em aparelho microondas e já com todos os constituintes da formulação. A microemulsão formada é imediatamente dispersa em água fria (2-4°C) sob agitação para formação das nanopartículas. Desvantagens: Necessidade de remover do excesso de água (por ultracentrifugação, liofilização ou diálise); uso de altas concentrações de surfactantes e co-surfactantes.

Evaporação de solvente: Os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico imiscível (por exemplo: clorofórmio) e a solução será emulsificada numa fase aquosa com co-solvente. Depois da evaporação do solvente orgânico, o lípido precipitará formando as nanopartículas. Desvantagens: Solvente orgânico residual; dispersões muito diluídas; produz micropartículas e não nanopartículas.

Difusão de solvente: Os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico miscível (por exemplo: acetona) e a solução será misturada numa fase aquosa com surfactante. Depois o solvente orgânico será evaporado. Desvantagens: Solvente orgânico residual; dificuldade de produzir as partículas em larga escala.

Dupla emulsão: Uma solução aquosa é emulsificada num lípido ou mistura de lípidos previamente derretidos, por forma a produzir uma emulsão primária w/o, sendo estabilizada por surfactantes adicionados na fase aquosa. Seguidamente a emulsão primária será dispersa numa segunda solução de surfactante sob constante agitação, formando uma dupla emulsão w/o/w. Desvantagens: Baixo conteúdo lipídico; difícil estabilidade; processo demorado e em múltiplas etapas.

Injeção de solvente (deslocamento): O lípido ou mistura de lípidos são solubilizados num solvente semi-polar e solúvel em água. A fase orgânica é rapidamente injectada, sob agitação constante na fase aquosa que contém o surfactante. Assim as nanopartículas lipídicas precipitam devido à distribuição do solvente a fase aquosa. Desvantagens: Dificil remoção de solvente; necessidade de uso de processos de liofilização ou evaporação a pressão reduzida; baixo conteúdo lipídico.

Membrana de contato: Uma fase lípido/óleo é difundida através dos poros de uma membrana para uma fase aquosa em fluxo tangencial, formando gotículas. As gotículas de óleo cristalizam, formando partículas lipídicas. Desvantagens: Saturação dos poros da membrana, que levam à sua obstrução; procedimento de limpeza e substituição de membranas frequente.

Extração de emulsões por fluídos supercríticos: Processo simultâneo de extração por fluidos supercríticos (difusão) dos solventes orgânicos da emulsão e dissolução lipídica. A expansão da fase orgânica leva à cristalização lipídica. Desvantagens: Uso de grandes quantidades

de solventes orgânicos. Necessidade de equipamento sofisticado.

Técnica de coacervação: As nanopartículas lipídicas são formadas a partir de uma solução micelar de sais alcalinos na presença de um agente polimérico estabilizante. A acidificação, por uma solução coacervante leva à descida do pH, causando troca de prótons e consequente precipitação do lípido. Desvantagens: Método não adequado para encapsulação de fármacos sensíveis ao pH.

Técnica "Phase inversion temperature": Inversão espontânea de uma emulsão o/w para uma do tipo w/o, provocado por tratamento térmico (através de ciclos de aquecimento/arrefecimento). A cristalização dos lípidos resulta da quebra da emulsão devido ao choque irreversível provocado pelo arrefecimento rápido. Desvantagens: Agregação das partículas; instabilidade das emulsões; diferentes excipientes influenciam o comportamento de inversão de fase.

"Spray Drier": O lípido e o fármaco são dissolvidos num solvente orgânico (por exemplo: clorofórmio). Em seguida, a solução é aspergida num aparelho, no qual o fluxo contínuo de ar quente evapora rapidamente o solvente das gotas aspergidas obtendo partículas secas. Para evitar a agregação das partículas e para aumentar as propriedades de fluxo, utiliza-se, por exemplo, lecitina juntamente com o lípido. Existe a variação da técnica spray-congealing. Desvantagens: Aplicado para obter micropartículas e não nanopartículas.

Quanto a propriedade intelectual relacionada com tecnologia de produção de nanopartículas:

- O documento US20060024374A1 (Gasco et al., 2006a, Gasco et al., 2006b) descreve formulações de nanopartículas de lipídicas sólidas para o tratamento de doenças oftálmicas, adequadas para administração tópica ocular e para a administração sistémica, com diâmetro médio compreendido entre 50 e 400 nm. Estas nanopartículas sendo obtidas pela técnica da microemulsão.

- O documento EP2413918A1 (Padois et al., 2012) refere-se a suspensão de nanopartículas de lípidos sólidos numa fase aquosa, com o fármaco minoxidil encapsulado, preparada por técnica de homogeneização a alta pressão a quente.

- O documento US20110171308A1 (Zhang et al., 2011b, Zhang et al., 2011a) relata um composto sólido sensível ao pH utilizado para preparações orais e um método de preparação destes. É pH sensível, podendo aumentar a absorção de fármacos no trato gastrointestinal ou melhorar outros desempenhos. O método de preparação é relatado como novo e utiliza solvente para dissolução do polímero pH sensível e do fármaco com posterior remoção do solvente.

- O documento CN102151250A (周亚球, 2011) descreve um novo método de preparação de nanopartículas lipídicas caracterizado por 5 etapas: (1) dissolução de componentes lipídicos, fármaco e pode ser incluso o tensoativo, em solvente orgânico miscível em água, correspondendo então a fase oleosa; (2) os compostos hidrofílicos dissolvido em água para formar uma fase aquosa; (3) depois procede-se a injeção, numa proporção de volume adequada, da fase oleosa na fase aquosa sob agitação, para obter uma dispersão sólida de

nanopartículas; (4) a dispersão é liofilizada para remover o solvente e entregar um produto seco; (5) Por fim, é hidratado para obter as nanopartículas lipídicas.

- O documento CN1490055A (强夏, 2004) relata um método para a preparação de um nanoestruturas lipídicas, caracterizado por 6 etapas: (1) óleo vegetal e um ácido gordo em proporção adequada são misturados formando a fase oleosa; (2) é adicionado à fase oleosa o emulsionante Span em proporção adequada; (3) essa mistura é aquecida entre 60-80 ° C, e adicionada um fármaco lipossolúvel, e a água em mesma temperatura com posterior utilização do homogeneizador a alto cisalhamento; (4) o emulsionante polissorbato dissolvido em água e aquecido, é adicionado sob agitação; (5) a preparação é submetida a ultra-som; (6) por fim, freeze-drying.

- O documento UA81093 (U) (Yevheniivna; et al., 2013) descreve um método para a produção de nanopartículas sólidas compreendida de reação entre ácidos gordos e o ingrediente ativo, em proporção adequada, no meio de solvente (clorofórmio) sob aquecimento. O solvente é finalmente evaporado, e o filme de lípidos é obtido.

- O documento US20130035279A1 (Venkataraman and Pawar, 2013) relata um método e um sistema de produção de nanopartículas termolábeis, constituídas de materiais biocompatíveis como lípidos e biopolímeros. Um sistema aerossol protótipo é descrito para produção em etapa única destas nanopartículas.

- O documento BR1020140173161A2 (Rigon; et al., 2016) descreve um processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas com trans-resveratrol (RES) por sonicação, utilizando lípido peguado, bem como as nanopartículas obtidas e seu uso na terapia antitumoral do melanoma.

- O documento CN101890170A (冯年平; et al., 2010) refere-se a tecnologia de formulação de nanopartículas lipídicas com lectina, sua aplicação e método de preparação por homogeneização a alta pressão a quente.

Além destes, vários outros documentos, como: CN1278682C, US8715736B2, CN102846552B (齐宪荣 and 高玮, 2014), RO128703A2 (Lacatusu Ioana et al., 2013), US8709487B1 (Kinnan and Schreuder-Gibson, 2014) e US6551619B1 (Penkler et al., 2003) descrevem formulações e métodos de obtenção de nanopartículas, porém não relacionadas com a técnica proposta nessa invenção.

A vasta investigação no campo de obtenção das partículas lipídicas, assim como os vários métodos desenvolvidos até agora para a sua produção, atestam das suas enormes potencialidades e interesse comercial. No entanto, a grande maioria dos métodos desenvolvidos até agora apresentam dificuldades para serem transferidos para a escala industrial, o que representa um grande impedimento para que este tipo de partícula possa efetivamente ter sucesso quer como transportadores de fármacos, quer em aplicações cosméticas ou diagnóstica. O novo método de obtenção de nanopartículas lipídicas apresentado neste documento, por microondas, é distinto de todos os até agora implementados. Na verdade, e tal como descrito anteriormente, já existe um método em que

usa o microondas, porém apenas com a finalidade de aquecimento dos constituintes da formulação em proposta de substituição da técnica tradicional por "banho térmico". Assim como especificado pelos próprios autores. Ou seja, o método *em si* é a microemulsão, em que utiliza o microondas apenas para prévio aquecimento dos componentes da formulação em substituição ao "banho térmico".

O método aqui apresentado possibilita a obtenção de partículas lipídicas do tipo SLN e NLC utilizando unicamente o reator microondas, sendo possível produzir partículas lipídicas num tempo muito curto (preferencialmente de 5-20 minutos). O método é robusto, reprodutível e permite controlar as características das partículas, tal como o tamanho das partículas, pelo ajuste de alguns fatores, como: o tempo do processo, a temperatura e a potência aplicada.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO E VANTAGENS

A presente invenção consiste no processo de obtenção de nanopartículas lipídicas, especialmente do tipo NLC (carregadores lipídicos nanoestruturados), através de técnica *one-pot* realizada unicamente por equipamento microondas.

A técnica é caracterizada sumariamente por:

Num tubo de microondas são acrescentados todos os constituintes: o lípido ou mistura de lípidos, surfactante(s), se aplicável, co-surfactante(s), solução aquosa e o composto(s) ativo(s) para fins terapêuticos e/ou preventivos e/ou nutricionais e/ou cosméticos e/ou diagnóstico, e submetido ao aquecimento em temperatura igual ou superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos por um determinado tempo (1 a 60 minutos) e agitação (baixa, média ou alta). Ou ainda, num primeiro momento são acrescentados ao tubo de microondas os constituintes lipídicos, surfactante(s) e, se aplicável, co-surfactante(s) e composto(s) ativo(s); este tubo de microondas é submetido ao aquecimento em temperatura igual ou superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos por um determinado tempo (1 a 60 minutos) e agitação (baixa, média ou alta). À posteriori é adicionada a fase aquosa no mesmo tubo que então é novamente submetido ao aquecimento em temperatura igual ou superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos por um determinado tempo (1 a 60 minutos) e agitação (baixa, média ou alta).

No final do processo realizado são já obtidas as nanoemulsões, bastando deixar arrefecer - com ou sem agitação, com ou sem choque térmico - até atingir a temperatura ambiente para a solidificação da matriz lipídica, com a consequente formação das nanopartículas lipídicas *em si*.

PROBLEMAS TÉCNICOS RESOLVIDOS

Por ser um processo em *one-pot* está associado a economia de tempo e de recursos, além de maior rendimento, praticidade e reprodutibilidade quando comparado com as demais técnicas que necessitam de várias etapas distintas, de transferências e de controles

diferenciados em cada etapa do processo (ICH, 2005, ICH, 2009a, Broadwater et al., 2005).

Além disso, a invenção tem como característica ser um sistema fechado, o que significa menor manipulação humana - o manuseamento de substâncias perigosas é minimizado, menor passividade a erros e assim maior reprodutibilidade. Como processos descontínuos têm associados riscos inerentes de variação entre lotes, assim, exigindo procedimentos e controles cuidadosos e complexos, processos contínuos são tipicamente preferidos na indústria farmacêutica e química em detrimento a processos descontínuos. Os processos contínuos podem diminuir o custo de produção por necessitarem de menos espaço, trabalho e de recursos, assim como por proporcionar uma elevada eficácia e uma melhor qualidade do produto desejado, em comparação com um processo descontínuo. Como tal, seria desejável proporcionar um processo contínuo para a formulação de nanopartículas (ICH, 2000, ICH, 2009a, ICH, 2009b).

Trata-se de um processo rápido (geralmente de 5 a 20 minutos), económico (para a produção apenas é necessário o equipamento microondas e seus utensílios próprios), mais controlável e mensurável, com menor manipulação humana, maior uniformidade de distribuição do aquecimento, controle da fusão dos constituintes da formulação e controle da energia aplicada necessária a formação das nanopartículas. Mais ainda, trata-se de uma técnica ecológica (sem necessidade de solventes orgânicos) e escalável para produções industriais. A presente invenção contorna ainda outros inconvenientes, como degradação de compostos ativos sensíveis a energia de sonicação e desprendimento de titânio da ponta de sonicação inerentes a técnica de Homogeneização de alto corte (High Shear Homogenization). Adicionalmente, torna possível evitar a etapa isolada de aquecimento convencional da técnica atrás mencionada e da Homogeneização de alta pressão a quente (High Pressure Hot Homogenization), bem como, contorna problemas como elevado stress da amostra, o baixo rendimento, os volumes de amostra relativamente altas exigidas e a necessidade de know-how especial.

A utilização de solventes orgânicos não é ecologicamente amigável, pois são potencialmente tóxicos e devem passar por etapa de remoção da formulação (Wissing et al., 2004), mesmo assim, ainda com o risco de existir quantidades residuais nas preparações feitas por técnicas como: "Evaporação de solvente" e "Difusão de solvente".

Evita ainda etapas adicionais (diluições, remoção do solvente aquoso por técnicas, como diafiltração) e aparelhagem adicional o que deixa o processo mais complexo, mais caro e passível a maiores controles de qualidade como nos processos "técnica microemulsão" e "técnica microemulsão assistida por microondas".

As nanopartículas lipídicas produzidas pelo processo da presente invenção estão dentro da escala manométrica, possuem potenciais zeta moderados, e polidispersão em faixa aceitáveis. A magnitude do potencial zeta, em todos os casos, é suficientemente elevada para proporcionar uma boa estabilidade física dos sistemas estabilizados por tensoativos não iónicos, tais como utilizados nesta invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Para obter uma completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se fazem referências, conforme se segue:

FIGURA 1: Processo de produção de nanopartículas lipídicas em etapa única podendo ou não ter choque térmico e agitação.

FIGURA 1A: Esquema da invenção em etapa única.

FIGURA 1B: Fluxograma da invenção em etapa única.

FIGURA 2: Processo de produção de nanopartículas lipídicas em duas etapas podendo ou não ter choque térmico e agitação.

FIGURA 2A: Esquema da invenção em duas etapas.

FIGURA 2B: Fluxograma da invenção em duas etapas.

FIGURA 3: Diagrama de Ishikawa para seleção dos fatores mais críticos considerados desenvolvimento do novo processo de obtenção das nanopartículas lipídicas por microondas - em negrito os fatores mais relevantes.

FIGURA 4: Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados para as respostas (4A) capacidade de carga, (4B) polidispersão "PI" e (4C) tamanho médio de partícula "size". Desenvolvimento otimizado da formulação com zidovudina.

FIGURA 5: Superfícies de Resposta para cada uma das três respostas consideradas no estudo de desenvolvimento da formulação com zidovudina. Resposta capacidade de carga (5A), polidispersão (5B) e tamanho médio de partícula (5C).

FIGURA 6: Gráficos de Pareto para a resposta polidispersão "PI" (6A) e tamanho médio de partícula "Size" (6B).

FIGURA 7: Imagens TEM da formulação selecionada da zidovudina e da nevirapina - sendo a figura 7A com o fármaco zidovudina e a figura 7B com o fármaco nevirapina.

FIGURA 8: Gráfico do estudo de liberação in vitro das formulações otimizadas com o fármaco zidovudina.

FIGURA 8A: Perfil de liberação da Zidovudina in vitro da formulação "exemplo 14" simulando o meio gástrico e temperatura corporal (pH 1.2 a 37°C). Os dados correspondem à média e desvio padrão para n=2.

FIGURA 8B: Perfil de liberação da Zidovudina in vitro a formulação "exemplo 14" simulando o meio fisiológico e temperatura corporal (pH 7.4 a 37°C). Os dados correspondem à média e desvio padrão para n=2.

FIGURA 9: Gráfico do estudo de estabilidade das formulações. As barras representam o tamanho médio das partículas em nm e os marcadores circulares representam o potencial zeta

em mv. Nesse estudo as formulações foram armazenadas como suspensões aquosas, a 4°C e protegidas da luz.

FIGURA 9A: Estudo de estabilidade do "exemplo 14", fármaco zidovudina.

FIGURA 9B: Estudo de estabilidade do "exemplo 15", fármaco nevirapina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo *one-pot* de síntese por micro-ondas de nanopartículas lipídicas sólidas com diâmetro médio de 30 a 900 nm, mais preferencialmente de 60 a 300 nm caracterizado por a síntese das nanopartículas ser realizada por aquecimento com micro-ondas a uma temperatura inferior a 90°C com agitação simultânea contínua, seguida de arrefecimento.

Num modo preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por a síntese das nanopartículas lipídicas compreender:

- i) colocação do lípido ou mistura de lipídios, surfactantes e, opcionalmente, co-surfactantes, solução aquosa e compostos ativos num tubo de micro-ondas;
- ii) aquecimento da mistura com energia de micro-ondas, com agitação simultânea;
- iii) arrefecimento até ser atingida a temperatura ambiente.

Num outro modo preferencial de realização da invenção, o processo de acordo com a reivindicação nº1 caracterizado por a síntese das nanopartículas lipídicas compreender:

- i) colocação do lípido ou mistura de lipídios, surfactantes e, opcionalmente, co-surfactantes e compostos ativos num tubo de micro-ondas;
- ii) aquecimento da mistura com energia de micro-ondas, com agitação simultânea;
- iii) adição de solução aquosa;
- iv) aquecimento da mistura com energia de micro-ondas, com agitação simultânea;
- v) arrefecimento até ser atingida a temperatura ambiente.

Num modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado pelo aquecimento ser efetuado a uma temperatura igual ou superior à temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, durante 1 a 60 minutos.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo tem um só passo de aquecimento e é caracterizado pelo aquecimento ser efetuado a uma temperatura de 5 a 20°C superior à temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, durante 5 a 20 minutos.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo tem dois passos de aquecimento e é caracterizado pelo aquecimento ser efetuado a uma temperatura de 5 a 15°C superior à temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, durante 5 a 15 minutos.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por o arrefecimento ser realizado sem agitação constante; com agitação constante até atingir a temperatura ambiente; ou através de agitação constante com choque térmico, para um arrefecimento parcial ou até atingir a temperatura ambiente, através de arrefecimento programado pelo próprio aparelho micro-ondas, por banho de gelo ou ainda uma combinação destes.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por a agitação ser de intensidade moderada a vigorosa, preferencialmente de 900 rpm. Num modo de realização ainda mais preferencial, a agitação é efetuada por adição de barra magnética ao tubo de microondas, com uma dimensão o maior possível de forma a permitir uma maior homogeneidade e agitação mais vigorosa.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado pelo volume final dos constituintes inseridos no tubo de microondas ser preferencialmente de 1/7 a 1/2 do volume do tubo, para garantir uma completa e controlada homogeneização durante o processo de agitação.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por o constituinte lipídico consistir num ou mais componentes selecionados de entre o grupo de ácidos gordos, esteróides, ceras, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos e, opcionalmente, fosfolípidos.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por o surfactante ou conjunto de surfactantes ser do tipo não iónico.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por o co-surfactante consistir num ou mais componentes selecionados do grupo butanol, hexanodiol, propilenoglicol, hexanol, ácido butírico e hexanóico, ésteres de ácido fosfórico, álcool benzílico.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por a solução aquosa ter um pH apropriado, preferencialmente entre 5 e 7, ajustável com soluções tampão, e conter opcionalmente sais, conservantes, antioxidantes, estabilizantes e marcadores.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por o lípido ou conjunto de lípidos estarem compreendidos numa proporção entre 1 e 20%, preferencialmente de 1,5 a 8%, do peso total; solução aquosa entre 70 e 96%, preferencialmente de 80 a 95,5%, do peso total; surfactantes de 1 a 20%, preferencialmente de 2 a 15%, do peso total; co-surfactantes entre 0 e 15%, preferencialmente de 0 a 10%, do

peso total; e, os compostos ativos entre 0 a 50% dos constituintes lipídicos, preferencialmente de 1 a 15%.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado pela incorporação de ligantes ou marcadores, específicos a cada formulação, na superfície das nanopartículas lipídicas.

Num outro modo ainda mais preferencial de realização da invenção, o processo é caracterizado por serem obtidas nanopartículas lipídicas sólidas com um diâmetro médio de 30 a 900nm, preferencialmente de 60 a 300nm, com polidispersão de 0,05 a 0,5, preferencialmente de 0,1 a 0,3, e potencial zeta de 10 a 70 mv, preferencialmente de 20 a 40mv.

A invenção refere-se ainda a nanopartículas lipídicas obtidas pelo processo descrito acima, preferencialmente nanopartículas lipídicas com um diâmetro médio de 30 a 900 nm, preferencialmente de 60 a 300 nm, com polidispersão de 0,05 a 0,5, preferencialmente de 0,1 a 0,3, e potencial zeta de 10 a 70 mV, preferencialmente de 20 a 40 mV.

O processo da invenção tem provado ser uma técnica surpreendentemente simples para a produção de nanopartículas lipídicas, o qual contém composto(s) ativo(s) que tem pelo menos um efeito fisiológico e/ou de diagnóstico eficaz.

Em particular, a tecnologia da presente invenção permite o fabrico *one-pot* das referidas partículas numa ou duas etapas - mas no mesmo tubo reacional e mesmo equipamento - e, se desejado, com composto(s) ativo(s) carregado(s) por essas nanoestruturas. Esta técnica permite o fabrico de pequenas, como também grandes quantidades, ou seja, é escalável. Contrariamente ao estado da arte de nanotecnologia, a técnica pode ser realizada de uma maneira muito simples e rápida, viabilizando a manufatura por pessoas sem know-how na área, bem como, é solucionado o problema da manipulação de substâncias perigosas. Substâncias instáveis (por exemplo, as substâncias sensíveis à energia de sonicação ou a solventes orgânicos), bem como, substâncias com distinta propriedade físico-química podem ser inseridas em nanopartículas à base de lípidos.

Através de ajustes nos principais fatores críticos do processo - como tempo, temperatura e eficiência de agitação (características da barra magnética, velocidade de agitação, volume total da formulação) - é possível obter nanopartículas lipídicas com as características desejadas.

A barra magnética adicionada ao tubo de microondas, em que os constituintes da preparação estão contidos, deve preferencialmente ser de tamanho o maior possível face ao diâmetro do tubo de microondas, de forma que permita uma maior homogeneidade e agitação mais vigorosa, conduzindo a melhores valores de polidispersão e tamanhos de partículas mais reduzidos das nanoemulsões e conseqüentemente das nanopartículas.

O volume final dos constituintes inseridos no tubo de microondas deve ser controlado e

suficiente, preferencialmente de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$, para garantir uma completa e controlada homogeneização durante o processo de agitação. Volumes muito grandes ou muito pequenos comprometem a homogeneização e consequentemente os parâmetros de qualidade das nanopartículas lipídicas.

Observa-se que, em geral, as nanopartículas obtidas por esta invenção apresentam tamanhos médios compreendidos entre 30 e 900 nm, preferencialmente entre 60 e 300 nm; uma polidispersão de entre 0,05 e 0,5, de preferência entre 0,1 e 0,3; e o potencial zeta num valor modular entre 10 e 70 mV, de preferência entre 20 e 40 mV. A eficiência de encapsulação e capacidade de carga, análise da microscópica de imagem, estudo de libertação in vitro e estabilidade se mostraram muito similares a técnica tradicional "Homogeneização a quente por ultrassonicação", através da realização de um comparativo. Sendo que em alguns aspectos o processo desta invenção entregou perfis superiores aos da técnica tradicional. Estes aspectos dependem muito de formulação para formulação - excipientes pré-selecionados, composto a ser encapsulado, e ajustes dos fatores críticos do processo aqui apresentado visando a otimização para cada formulação.

Relativamente a métodos que recorrem a aquecimento por micro-ondas existentes na literatura, o método descrito na presente invenção apresenta múltiplas vantagens.

Por exemplo, em comparação com o método descrito por Dunn et al. 2017, o presente método possibilita a produção de nanopartículas num range de tamanhos maior, entre 30 e 900 nm, o que para sistemas de entrega de fármacos é muito mais interessante. Para além disso o método descrito por Dunn et al. 2017 exige primeiro a formação de um filme lipídico nas paredes do tubo, com adição posterior da água, necessita de usar solventes orgânicos, clorofórmio, algo que o nosso método não usa. Adicionalmente pressupõe o uso de temperaturas elevadíssimas, mais de 200 °C, o que num ambiente aquoso, só é possível com baixa pressão, para que a água não entre em ebulição, logo o consumo energético é muito maior. Adicionalmente, a presente metodologia permite também a obtenção de NLC.

Por sua vez, em relação ao método de Shah et al. 2016, a principal diferença de nossa metodologia é que quando o processo de micro-ondas termina, as nanopartículas estão prontas; não havendo necessidade de dispersar em água. Este passo é demorado e dilui muito a suspensão. Um aumento da quantidade de água diminui o número de partículas por mL, o que para um processo industrial não é recomendado, pois pode aumentar o número de etapas para eliminar as maiores quantidades de água. Adicionalmente, a presente metodologia permite também a obtenção de NLC.

A preparação das nanopartículas mencionadas na invenção pode ocorrer numa etapa única, de forma preferencial, ou em duas etapas, para alguns casos, por exemplo, de compostos ativos muito lipofílicos.

Preparação em etapa única: num tubo de microondas apropriado são acrescentados o lípido ou mistura de lípidos, surfactante(s) e, opcionalmente, co-surfactante(s), solução aquosa (com pH apropriado e ou outro constituinte necessário), e pode ainda conter o composto(s) ativo(s)

para fins terapêuticos e/ou preventivos e/ou nutricionais e/ou cosméticos e/ou diagnóstico que podem ter características lipofílicas ou hidrofílicas. É inserida uma barra magnética e depois é vedado com a tampa específica do tubo de microondas. Em seguida, este tubo com a preparação é colocado no reator de microondas (CEM Discover SP®) e submetido a uma temperatura igual ou superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, preferencialmente de 5 a 20 °C superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, e a uma agitação magnética baixa, média ou alta, preferencialmente alta (aproximadamente 900 rpm), e a um tempo entre 1 a 60 minutos, preferencialmente 5 a 20 minutos.

Preparação em 2 etapas: Num tubo de microondas apropriado são colocados o lípido ou mistura de lípidos, surfactante(s) e, opcionalmente, co-surfactante(s), e pode ainda conter o composto(s) ativo(s). É inserida uma barra magnética e depois é vedado com a tampa específica do tubo de microondas. Em seguida, este tubo com a preparação é colocado no reator de micro-ondas (CEM Discover SP®) e submetido a uma temperatura igual ou superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, preferencialmente de 5 a 15 °C superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, e a uma agitação magnética baixa, média ou alta, preferencialmente alta (aproximadamente 900 rpm), e a um tempo entre 1 a 60 minutos, preferencialmente 5 a 15 minutos. Depois desta etapa uma solução aquosa (com pH apropriado e ou outro constituinte necessário) é adicionada ao mesmo tubo de microondas e submetido a uma temperatura igual ou superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, preferencialmente de 5 a 15 °C superior a temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, e a uma agitação magnética baixa, média ou alta, preferencialmente alta (aproximadamente 900 rpm), e a um tempo entre 1 a 60 minutos, preferencialmente 5 a 15 minutos.

Opcionalmente, o que varia com a otimização de cada caso, as nanoemulsões formadas podem ser ou não submetidas a imediato choque térmico e podem ser ou não submetidas a agitação até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das nanopartículas em si. Para tanto existem algumas opções de arrefecimento, dentre elas:

- submeter imediatamente a choque térmico, que pode ser parcial ou até atingir a temperatura ambiente. O choque térmico pode se dar por mecanismo de resfriamento programado pelo próprio aparelho microondas ou por banho de gelo ou ainda uma combinação destes. A agitação deve ser constante até atingir a temperatura ambiente;
- submeter apenas a agitação constante até atingir a temperatura ambiente;
- não submeter nem a choque térmico nem a agitação e progressivamente a temperatura ambiente ser atingida.

Os componentes lipídicos utilizados no processo da presente invenção podem ser do grupo dos ácidos gordos, esteroides, ceras, monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos. Pode-se ainda juntar fosfolípidos.

Os agentes tensoativos podem ser selecionados entre o grupo dos não iônicos.

Os co-agentes tensioativos, quando aplicável, são selecionados, porém não se restringindo, entre o grupo que compreende: álcoois de baixo peso molecular ou glicóis, tais como por exemplo, butanol, hexanol, hexanodiol, propilenoglicol; ácidos gordos de baixo peso molecular, tais como o ácido butírico, ácido hexanóico, ésteres de ácido fosfórico e álcool benzílico, dentre outros.

Quanto à composição da formulação, esta pode ser: componentes lipídicos, entre 1 e 20%, preferencialmente 1.5 e 8% (por massa total); solução aquosa, entre 70 e 96%, preferencialmente 80 e 95.5% (por massa total); surfactantes, 1 e 20%, preferencialmente 2 e 15% (por massa total); co-surfactantes 0 e 15%, preferencialmente 0 e 10% (por massa total). O processo da presente invenção apresenta, em relação ao estado da arte, numerosas vantagens, entre as quais, por exemplo: melhor controle do processo, operação consideravelmente simplificada, rápida, escalável, sustentável, operação segura e econômica, processo todo fechado, *one-pot*, e utilizando necessariamente apenas um equipamento. O processo da não invenção não requer utilização de nenhum solvente orgânico, nem energia de sonicação, nem contaminação de metal pesado, ou técnica agressiva e apresenta risco mínimo de contaminação cruzada.

As nanopartículas lipídicas, de acordo com a presente invenção, têm um diâmetro médio compreendido entre 30 e 900 nm, preferencialmente entre 60 e 300 nm; uma polidispersão de entre 0,05 e 0,5, de preferência entre 0,1 e 0,3; e o potencial zeta tnum valor modular entre 10 e 70 mv, de preferência entre 20 e 40 mv. Parâmetros esses ajustáveis de acordo com cada objetivo. Assim, podem ser empregues com sucesso como veículos para compostos ativos que têm, pelo menos, um efeito fisiológico e / ou de diagnóstico eficaz.

Para ilustrar a invenção os seguintes exemplos são apresentados de forma sumarizada na tabela 1 e de forma detalhada abaixo:

Tabela 1: Tabela geral com todas as formulações utilizadas como exemplos da Invenção (1-a) e resultados das análises (1-b).

Tabela 1-a

Exemplos	Variações das Condições Experimentais											
	n.º etapas	Tempo	Temp. ^{*1}	LS ^{*2}	LI ^{*3}	LS:LI ^{*4}	L:T:80 ^{*5}	L:S:A ^{*6}	pH S.A. ^{*7}	Fármaco	Arref. ^{*8}	
1	1	15 min ^{*20}	90°C	compritol	migliol	4:1	1:1,5	1:10	7,4	na ^{*13}	T.A. ^{*14}	
2	1	15 min	90°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:20	7,4	na	C.T.t + AG ^{*15}	
3	1	15 min	90°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:20	7,4	na	T.A. + AG ^{*16}	
4	1	15 min	90°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:30	7,4	na	C.T.t + AG	
5	1	15 min	90°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:30	7,4	na	T.A. + AG	
6	1	15 min	90°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:40	7,4	na	C.T.t + AG	
7	1	15 min	90°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:40	7,4	na	T.A. + AG	
8	1	15 min	90°C	preciról	migliol	5:1	1:1,5	1:40	5,5	na	T.A. + AG	
9	1	15 min	90°C	preciról	migliol	3:1	1:1,5	1:40	5,5	na	T.A. + AG	
10	1	15 min	90°C	preciról	migliol	4:1	1:1,5	1:50	5,5	na	T.A. + AG	
11	1	20 min	90°C	preciról	migliol	2:1	1:2,0	1:50	5,5	na	T.A. + AG	
12	1	20 min	90°C	preciról	migliol	2:1	1:1,0	1:50	5,5	na	T.A. + AG	
13	1	10 min	90°C	preciról	migliol	5:1	1:2,0	1:50	5,5	na	T.A. + AG	
14	1	10 min	90°C	preciról	migliol	3:1	1:1,58	1:50	5,5	AZT ^{*18}	C.T.p + AG ^{*17}	
15	2	10 min/etapa	90°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:50	8,7	NVP ^{*19}	C.T.p + AG	
16	1	20 min	120°C	compritol	migliol	3:1	1:1,5	1:50	8,7	NVP	C.T.p + AG	
17	2	10 min/etapa	90°C	preciról	ácido obico	3:1	1:1,5	1:50	8,7	NVP	C.T.p + AG	
18	1	20 min	120°C	preciról	ácido oleico	3:1	1:1,5	1:50	8,7	NVP	C.T.p + AG	
19	2	10 min/etapa	90°C	compritol	na	na	1:1,5	1:50	8,7	na	C.T.p + AG	
20	1	10 min	90°C	preciról	na	na	1:1,58	1:50	5,5	na	C.T.p + AG	

Tabela 1-b

Exemplos	Respostas Analisadas			
	Tamanho ^{*9}	PI ^{*10}	Zeta ^{*11}	CC ^{*12}
1	853 nm	0,376	na	na
2	703 nm	0,356	na	na
3	716 nm	0,361	na	na
4	233 nm	0,278	na	na
5	183 nm	0,298	na	na
6	93 nm	0,218	na	na
7	95 nm	0,205	na	na
8	759 nm	0,398	na	na
9	121 nm	0,309	na	na
10	162 nm	0,231	na	na
11	219 nm	0,390	na	na
12	902 nm	0,395	na	na
13	288 nm	0,374	na	na
14	113 nm	0,216	(-) 21 mv	1,40%
15	69 nm	0,263	(-) 22 mv	0,20%
16	73 nm	0,261	(-) 21 mv	0,02%
17	459 nm	0,371	na	na
18	579 nm	0,381	na	na
19	67 nm	0,198	(-) 19 mv	na
20	118 nm	0,234	(-) 15 mv	na

Legenda da tabela 1: *1: temperatura; *2: lípido sólido; *3: lípido líquido; *4: proporção de lípido sólido por lípido líquido; *5: proporção de lípidos por surfactante Tween 80; *6: proporção de lípidos por solução aquosa; *7: pH da solução aquosa; *8: arrefecimento utilizado; *9: tamanho das nanopartículas em nm (nanômetro); *10: polidispersão das nanopartículas; *11: potencial zeta em mv (milivolts); *12: capacidade de carga do fármaco pela matriz lipídica. *13: não aplica-se; *14: arrefecimento em temperatura ambiente (sem agitação nem choque térmico); *15: arrefecimento com choque térmico até atingir a temperatura ambiente e com agitação constante. *16: arrefecimento em temperatura ambiente e com agitação constante.

*17: arrefecimento com choque térmico parcial (até 70 a 60°C) e agitação constante e depois completa o arrefecimento em temperatura ambiente; *18: AZT: zidovudina. Tem logP em cerca de 0.05; *19: NVP: nevirapina. Tem logP em cerca de 2.5; *20: tempo em minuto.

EXEMPLO 1

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 400 mg de Compritol® ATO 888 (lípidio sólido),

100 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 750 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa em pH 7,4 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/10

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 4/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado, o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente sem agitação magnética por pelo menos 10 minutos.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 853nm e polidispersão de 0.376.

EXEMPLO 2

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 187.5 mg de Compritol® ATO 888 (lípidio sólido), 62.5 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 312.5 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa em pH 7,4 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/20

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram inseridos em banho de gelo (choque térmico) com agitação magnética constante por 10 minutos. Tempo necessário para a formulação atingir a temperatura ambiente.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 703 nm e polidispersão de 0.356.

EXEMPLO 3

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 187.5 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípidio sólido), 65.5 mg de Mygliol (lípidio líquido), 312.5 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa em pH 7,4 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl IM) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/20

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos. As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 716 nm e polidispersão de 0.361.

EXEMPLO 4

(placebo)

Num um tubo de microondas foi adicionado 125.25 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípidio sólido), 41.75 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 250.5 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa em pH 7,4 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl IM) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/30

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram inseridos em banho de gelo (choque térmico) com agitação magnética constante por 10 minutos. Tempo necessário para a formulação atingir a temperatura ambiente.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 233 nm e polidispersão de 0.278.

EXEMPLO 5

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 125.25 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípidio sólido), 41.75 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 250.5 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa em pH 7,4 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl IM) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/30

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípido sólido / lípido líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos. As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 183 nm e polidispersão de 0.298.

EXEMPLO 6

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 93.75 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípido sólido),

31.25 mg de Mygliol 812 (lípido líquido), 18.75mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa em pH 7,4 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/40

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípido sólido / lípido líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram inseridos em banho de gelo (choque térmico) com agitação magnética constante por 10 minutos. Tempo necessário para a formulação atingir a temperatura ambiente.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 93 nm e polidispersão de 0.218.

EXEMPLO 7

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 93.75 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípido sólido), 31.25 mg de Mygliol 812 (lípido líquido), 18.75mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa em pH 7,4 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/40

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípido sólido / lípido líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 95 nm e polidispersão de 0.205.

EXEMPLO 8

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 104 mg de Precirol® ATO 5 (lípidio sólido), 20.8 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 187.5 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/40

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 5/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 759.5 nm e polidispersão de 0.398.

EXEMPLO 9

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 93.75 mg de Precirol® ATO 5 (lípidio sólido), 31.25 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 187.5 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/40

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 121 nm e polidispersão de 0.309.

EXEMPLO 10

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 96 mg de Precirol® ATO 5 (lípidio sólido), 24 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 180 mg de Tween 80, 6mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípido sólido / lípido líquido: 4/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 15 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos. As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 162 nm e polidispersão de 0.231.

EXEMPLO 11

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 66.6 mg de Precirol® ATO 5 (lípido sólido), 33.3 mg de Mygliol 812 (lípido líquido), 200 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/2

Proporção lípido sólido / lípido líquido: 2/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 20 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos. As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 219 nm e polidispersão de 0.390.

EXEMPLO 12

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 66.6 mg de Precirol® ATO 5 (lípido sólido), 33.3 mg de Mygliol 812 (lípido líquido), 200 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1

Proporção lípido sólido / lípido líquido: 2/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 20 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos. As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 902 nm e polidispersão de 0.395.

EXEMPLO 13

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 83.3 mg de Precirol® ATO 5 (lípido sólido), 16.7 mg de

Mygliol 812 (lípidio líquido), 200 mg de Tween 80, 5mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 2/1

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 5/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões obtidas foram deixadas arrefecer a temperatura ambiente com agitação magnética por ao menos 10 minutos.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 288 nm e polidispersão de 0.374.

EXEMPLO 14

(com o fármaco Zidovudina)

Num tubo de microondas foi adicionado 75 mg de Precirol® ATO 5 (lípidio sólido), 25 mg de Mygliol 812 (lípidio líquido), 150 mg de Tween 80, 15 mg de zidovudina (fármaco), 5mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.58

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões passou imediatamente ao programa de arrefecimento do microondas indo para os 70°C. Após esse programa o tubo de microondas com a formulação foi retirado do equipamento e deixado completar o arrefecimento naturalmente até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das NLC.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 113 nm, polidispersão de 0.216, potencial zeta de -21 mv, análise TEM comprovou o tamanho destas nanopartículas e mostrou que essas têm forma esférica (figura 7A). Eficiência de encapsulação de 23%, capacidade de carga de 1.4%. Ensaio de liberação do fármaco mostrou em meio gástrico mais de 50% do fármaco permanece na nanopartícula sem ser libertado e ao menos 24 horas são necessárias para libertar 100% do fármaco em meio fisiológico desta nanoformulação (figura 8 - 8A e 8B).

Quanto a estabilidade física da formulação, observou-se que se manteve estável pelo tempo total avaliado de 45 dias, contudo, com apenas 22 dias já evidenciou alto decaimento (superior a 50%) para a resposta capacidade de carga (figura 9A).

A abordagem do desenvolvimento desta formulação com o fármaco zidovudina é detalhada em seguida.

- *Previamente foi realizado um estudo de pré-formulação que consistiu das seguintes etapas:* a. Teste de degradação do fármaco zidovudina submetida a reator de microondas, nas condições: 20 mg de zidovudina foi colocado no tubo de microondas, solubilizado com 5 mL de água ultrapura e submetido a 90°C por 10 minutos em microondas. Posteriormente a zidovudina foi quantificada por espectrofotômetro e o valor do doseamento foi equivalente a quantidade pesada, ou seja, não evidenciou degradação.

b. Foi feita uma otimização da metodologia, não sendo necessário o choque térmico da formulação ao sair do microondas. Pois a melhoria de tamanho de partícula e ou polidispersão era insignificante, enquanto que havia perda capacidade de carga das nanopartículas avaliadas sugerindo que o choque térmico estava contribuindo para parcial liberação do fármaco da matriz lipídica.

c. Com base em estudos preliminares de desenvolvimento de nanopartícula lipídica tipo NLC por técnica tradicional de homogeneização a quente por ultrasonicação, com finalidade comparativa, é que fixamos a escolha qualitativa do lípido sólido, líquido, surfactante e pH da solução aquosa.

d. Através de testes preliminares fizemos uma avaliação da proporção de lípidos : solução aquosa de 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:50. Observamos que para a composição de lípidos e surfactante utilizados nesse estudo a melhor proporção de lípido : solução aquosa era a de 1:50. Sendo esse fator então fixado.

- *Construção da Superfície de Resposta e seleção da formulação otimizado.*

a. Foi feito um design composto central e delineamento da superfície resposta para assim identificar a condição experimental ótima que satisfaça simultaneamente a três importantes respostas

- capacidade de carga (LC), polidispersão (PI) e tamanho médio das partículas. Alguns parâmetros foram fixados previamente, resultado do estudo de pré-formulação. Sendo selecionadas para continuação desse estudo apenas duas variáveis quantitativas, são elas: proporção de LL: LS (lípido líquido e lípido sólido) num intervalo de 36.7 mg LL para 63.3 mg SL e 13.3 mg LL para 86.7 mg SL, e quantidade do surfactante Tween 80, num intervalo de 79.3 a 220.7 mg. A tabela 2 apresenta a matrix das condições experimentais com as combinações dos níveis inferior (-1) e superior (+1), pontos axiais e replicação do ponto central, resultando no total de 13 experimentos com a finalidade de análise da influência das variáveis desse estudo.

Tabela 2: Desenho experimental realizado para o desenvolvimento otimizado da formulação com zidovudina pela metodologia da invenção.

Ensaios	Variáveis independentes	
	Quantidade	Proporção
	de Tween-80 (mg)	LL:SL (mg)
1	-1 (100)	-1 (33,3:66,7)
2	-1 (100)	+1 (66,7:100)
3	+1 (200)	-1 (33,3:66,7)
4	+1 (200)	+1 (66,7:100)
5	-1/4 (79,37)	0 (25:75)
6	+1/2 (220,7)	0 (25:75)
7	0 (150)	-1/2 (36,7:63,3)
8	0 (150)	+1/2 (13,3:86,7)
9*	0 (150)	0 (25:75)
10*	0 (150)	0 (25:75)
11*	0 (150)	0 (25:75)
12*	0 (150)	0 (25:75)
13*	0 (150)	0 (25:75)

* Replicações do ponto central

b. O diagrama de Pareto mostrado na figura 4 (4A, 4B, 4C) ilustra os efeitos dos fatores individuais e as suas interações. O comprimento de cada barra é proporcional ao valor absoluto do coeficiente de regressão associado ou efeito estimado. Os efeitos de todos os parâmetros e as interações foram padronizados (cada efeito foi dividido pelo seu erro padrão). A ordem na qual as barras são exibidas corresponde à ordem do tamanho do efeito. O gráfico inclui uma linha vertical que indica o limite de significância estatística de 95%. Um efeito foi significativo, por conseguinte, se a barra correspondente cruzado esta linha vertical.

c. Foram construídos gráficos da Superfície de Resposta bidimensional (curvas de contorno) ajustados aos dados experimentais para cada resposta (figura 5: 5A, 5B, 5C) para identificar as condições ótimas para a análise.

d. Um modelo quadrático estatisticamente significativo, correspondendo a 95%, 93% e 68% da variância para respostas L.C., PI e tamanho médio de partícula, respectivamente, foi ajustada aos dados, descrevendo a relação entre as respostas máximas e as condições experimentais ótimas. O modelo de regressão quadrática obtida são os seguintes:

Capacidade de carga (L.C.) = $-45.91882 + 0.08973x - 0.00024x^2 + 1.11304y - 0.00741y^2 - 0,00020x0079$

Polidispersão (PI) = $6.02791 - 0.00751x + 0.00003x^2 - 0.14017y + 0.00095y^2 - 0.00001xy$

Tamanho médio de partícula = $12861.01158 - 27.19887x + 0.13332x^2 - 282.37724y + 2.21025y^2 - 0.26229xy$

Onde X e Y são quantidade de Tween 80 e proporção de LL:SL, respectivamente. Das

superfícies obtidas, os valores críticos encontrados foram 158 mg T-80 e 27 mg LL: 73 mg SL para resposta L.C. Para a resposta PI os valores críticos foram 150mg T-80 e 25mg LL: 75 mg SL. E 175mg T-80 e 26mg LL: 74mg SL para a resposta tamanho médio de partícula.

e. A partir da análise da metodologia de superfície de resposta, foi possível determinar as condições do processo para otimizar simultaneamente todas as respostas de interesse no presente estudo, uma vez que os valores críticos para cada resposta foram semelhantes. Desta forma, a quantidade de T-80 foi fixada em 158 mg e a proporção de LL: SL foi fixada em 25mg LL: 75mg SL para a formulação desenvolvida.

EXEMPLO 15

(com o fármaco Nevirapina)

Processo em 2 etapas.

Etapa 1. Num tubo de microondas foi adicionado 75 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípidos sólidos), 25 mg de Mygliol 812 (lípidos líquidos), 150 mg de Tween 80, 2 mg de nevirapina (fármaco) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas. O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

Etapa 2. Ao tubo de microondas foi adicionado 5mL de solução aquosa em pH 8,7 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M). O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidos sólidos / lípidos líquidos: 3/1

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões passou imediatamente ao programa de arrefecimento do microondas indo para os 70°C. Após esse programa o tubo com a formulação foi retirado do equipamento e deixado completar o arrefecimento naturalmente até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das NLC.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 69 nm, polidispersão de 0.263, potencial zeta de -22 mv, análise TEM comprovou o tamanho destas nanopartículas e mostrou que essas têm forma esférica (figura 7B). Eficiência de encapsulação de 42%, capacidade de carga de 0.2%. Estabilidade física desta formulação foi observada por 30 dias para todos os parâmetros avaliados. Tempo este em que o estudo de estabilidade foi conduzido (figura 9B).

A abordagem do desenvolvimento desta formulação com o fármaco nevirapina é detalhada em seguida.

- *Previamente foi realizado um estudo de pré-formulação que consistiu das seguintes etapas:* a. Teste de degradação do fármaco nevirapina submetida a reator de microondas, nas condições: 2 mg de nevirapina foi colocado no tubo de microondas, solubilizado com 5 mL de água ultrapura e submetido a 100°C por 10 minutos em microondas. Posteriormente a nevirapina foi quantificada por espectrofotometro e o valor do doseamento foi equivalente a quantidade pesada.
- b. Foi feito um estudo de solubilidade da nevirapina frente a vários lípidos sólidos e líquidos - conforme pode ser visualizado na tabela 3. Destes, foram pré-selecionados para permanecerem no estudo os lípidos sólidos: Compritol® ATO 888, Precitol® ATO 5, Ácido Esteárico e Superpolystrate e os lípidos líquidos: Miglyol 812 e Ácido oleico.

Tabela 3: Teste de solubilidade do fármaco nevirapina frente a variados lípidos.

Lípidios	Resultados	Metodologia
Ácido esteárico	solúvel solúvel	1:100 NVP/lípido
Precitol ato 5	não solúvel não solúvel	
Cetyl Palmitate Pellets	não solúvel não solúvel	
Dynasan 116	não solúvel não solúvel	
Apifil	não solúvel solúvel solúvel	
Witepsol E76	não solúvel	
Witepsol S58	solúvel	
Witepsol 551		
Softisan 100		
Compritol 888 ato		
Superpolystrate Miglyol 812		

c. O pH escolhido foi o 8.7, por ser correspondente ao ponto isoelétrico do fármaco nevirapina, visando contribuir para a maior preferência e retenção da forma molecular da nevirapina pela matriz lipídica na formulação. Assim, a fase aquosa é composta por tampão Hepes ajustada com NaCl 1M. Nesse estágio o lípido sólido Ácido Esteárico foi eliminado do estudo por ser incompatível com meio alcalino. Os lípidos sólidos que escolhidos a permanecer nesse estudo foram: Compritol® ATO 888, Precitol® ATO 5.

d. A quantidade de NVP foi fixada em 2mg por ser um valor médio em que já se evidencia saturação na fase lipídica. E a o meio de adição da NVP era na fase lipídica devido a alta lipofilicidade desta droga.

e. Alguns fatores qualitativos foram fixados. O surfactante foi fixado no Tween 80 por suas

caraterísticas de ser um surfactante estérico e não ser tóxico. Sendo este adicionado a fase lipídica da preparação.

f. Fatores quantitativos também foram fixados tomando como base vários testes e conhecimento prévio adquirido, visando satisfazer a esta variedade de lípidos desta investigação, nessa invenção demonstrados em alguns exemplos - figura 4. Por isso, a proporção de massa lipídica : solução aquosa foi fixada em 1:50 (w/w). Enquanto de a proporção lípido sólido : lípido líquido foi fixado em 3:1 (75mg:25mg) e a proporção de massa lipídica total : surfactante foi fixado em 1:1,5 (100mg:150mg).

g. Foi feito um teste usando os parâmetros de 90°C de temperatura por 10 minutos em agitação alta no reator de microondas. Contudo, a nevirapina ficou praticamente toda precipitada, parte floculada e com várias partículas grosseiras de lípidos na preparação final. A nevirapina é um fármaco muito hidrofóbico. Assim, foram feitas otimizações e variações da metodologia da invenção, através do ajuste de fatores críticos do processo, como tempo e temperatura na aplicação da metodologia em etapa única e em duas etapas, o que permitirá avaliar qual destas seria a mais adequada ao desenvolvimento desta formulação.

h. O arrefecimento foi fixado, sendo um arrefecimento parcial sob agitação para formulação atingir rapidamente 70°C (programado no próprio reator microondas) e conclusão do arrefecimento em temperatura ambiente sem agitação.

- Planeamento fatorial empregado no desenvolvimento da formulação após os estudos de pré-formulação:

a. Foi feito um planeamento fatorial 2^3 completo deste estudo (tabela 4) para otimização das respostas: capacidade de carga (LC), tamanho de partícula (SIZE) e polidispersão (PI). Os três fatores críticos selecionados para essa otimização foram os fatores qualitativos lípido sólido, lípido líquido e processo de produção - porém, no fator processo de produção, que indicará se o processo deve ser em etapa única ou em 2 etapas, estão contidos 2 fatores quantitativos que são tempo e temperatura. Os demais fatores foram fixados na etapa de pré-formulação.

Tabela 4: Planeamento Fatorial realizado para o desenvolvimento da formulação com nevirapina pela metodologia da invenção

Etapas	Variáveis independentes		
	Lípido Sólido	Lípido Líquido	Processo de produção
1.	-1 (Compritol)	-1 (Miglyol)	-1 (uma etapa)
2.	+1 (Precirol)	-1 (Miglyol)	-1 (uma etapa)
3.	-1 (Compritol)	+1 (Ácido oleico)	-1 (uma etapa)
4.	+1 (Precirol)	+1 (Ácido oleico)	-1 (uma etapa)
5.	-1 (Compritol)	-1 (Miglyol)	+1 (duas etapas)
6.	+1 (Precirol)	-1 (Miglyol)	+1 (duas etapas)
7.	-1 (Compritol)	+1 (Ácido oleico)	+1 (duas etapas)
S	+1 (Precirol)	+1 (Ácido oleico)	+1 (duas etapas)

b. Para a resposta "PI" o fator lípido líquido e lípido sólido foram estatisticamente significativos (ver Gráfico Pareto da figura 6A), indicando que para menores respostas de polidispersão o lípido líquido a ser selecionado é o Miglyol 812, e o lípido sólido a ser selecionado é o Compritol[®] ATO 888. Para a resposta "SIZE" apenas o fator lípido líquido foi estatisticamente significativo ($p = 0.05$), indicando o nível (-) do fator lípido líquido, ou seja, as formulações com Miglyol 812 como as formulações que entregaram valores de tamanho de partículas menores que 400 nm (ver Gráfico Pareto da figura 6B). Para a resposta "LC" foram avaliadas apenas as formulações que entregaram valores próximos dos aceitáveis para as respostas "SIZE" e "PI". Através desses resultados ficou evidente que o processo de produção de uma etapa deveria ser eliminado do desenvolvimento desta formulação, nas condições investigadas.

c. Assim, os fatores qualitativos do planejamento fatorial conduzido foram fixados e a formulação otimizada da nevirapina foi selecionada.

EXEMPLO 16

(com o fármaco Nevirapine)

Num tubo de microondas foi adicionado 75 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípido sólido), 25 mg de Miglyol 812 (lípido líquido), 150 mg de Tween 80, 15 mg de nevirapina (fármaco), 5mL de solução aquosa em pH 8,7 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípido sólido / lípido líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 20 minutos a 120°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões passou imediatamente ao programa de arrefecimento do microondas indo para os 70°C. Após esse programa o tubo de microondas com a formulação foi retirado do equipamento e deixado completar o arrefecimento naturalmente até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das NLC.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 73 nm,

polidispersão de 0.261, potencial zeta de -21 mv. Eficiência de encapsulação de 2.75%, capacidade de carga de 0.02%.

EXEMPLO 17

(com o fármaco Nevirapina)

Processo em 2 etapas.

Etapa 1. Num tubo de microondas foi adicionado 75 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípidio sólido), 25 mg de ácido oleico (lípidio líquido), 150 mg de Tween 80, 2 mg de nevirapina (fármaco) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas. O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

Etapa 2. Ao tubo de microondas foi adicionado 5mL de solução aquosa em pH 8,7 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M). O tubo foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 3/1

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões passou imediatamente ao programa de arrefecimento do microondas indo para os 70°C. Após esse programa o tubo com a formulação foi retirado do equipamento e deixado completar o arrefecimento naturalmente até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das NLC.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 459 nm e polidispersão de 0.371.

EXEMPLO 18

(com o fármaco Nevirapina)

Num tubo de microondas foi adicionado 75 mg de Compritol[®] ATO 888 (lípidio sólido), 25 mg de ácido oleico (lípidio líquido), 150 mg de Tween 80, 15 mg de nevirapina (fármaco), 5mL de solução aquosa em pH 8,7 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

Proporção lípidio sólido / lípidio líquido: 3/1

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 20 minutos a 120°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões passou imediatamente ao programa de arrefecimento do microondas indo para os 70°C. Após esse programa o tubo com a formulação foi retirado do equipamento e deixado completar o

arrefecimento naturalmente até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das NLC.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 579 nm e polidispersão de 0.381.

EXEMPLO 19

(placebo)

Processo em 2 etapas.

Etapa 1. Num tubo de microondas foi adicionado 75 mg de Compritol® ATO 888 (lípidio sólido), 150 mg de Tween 80 e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas. O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

Etapa 2. Ao tubo de microondas foi adicionado 5mL de solução aquosa em pH 8,7 (tampão Hepes mais ajuste com NaCl 1M). O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.5

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões passou imediatamente ao programa de arrefecimento do microondas indo para os 70°C. Após esse programa o tubo com a formulação foi retirado do equipamento e deixado completar o arrefecimento naturalmente até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das SLN.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.6 - tamanho médio de 67 nm, polidispersão de 0.198 e potencial zeta de -19mv.

EXEMPLO 20

(placebo)

Num tubo de microondas foi adicionado 75 mg de Precirol® ATO 5 (lípidio sólido), 150 mg de Tween 80 e 5mL de solução aquosa (água ultrapura MiliQ) e uma barra magnética com tamanho maior possível que caiba no tubo de microondas.

Proporção fase lipídica / fase aquosa: 1/50

Proporção fase lipídica / surfactante: 1/1.58

O tubo de microondas foi devidamente fechado com tampa hermética apropriada e inserido no equipamento microondas por 10 minutos a 90°C.

No final do tempo programado o tubo de microondas com nanoemulsões passou imediatamente ao programa de arrefecimento do microondas indo para os 70°C. Após esse programa o tubo de microondas com a formulação foi retirado do equipamento e deixado completar o arrefecimento naturalmente até atingir a temperatura ambiente com a consequente formação das SLN.

As nanoformulações lipídicas obtidas tiveram - através de n.º 6 - tamanho médio de 118 nm, polidispersão de 0.234 e potencial zeta de -15mv.

APLICAÇÃO INDUSTRIAL

As nanopartículas lipídicas têm cada vez mais suscitado muito interesse por parte da indústria, particularmente farmacêutica (Kuchler et al., 2009, Wissing et al., 2004), cosmética (Wissing and Muller, 2003, Wissing et al., 2004) alimentar (Jee et al., 2006, Weiss et al., 2008) e têxtil.

A presente invenção insere-se na área da nanotecnologia, especificamente a tecnologia de produção de nanopartículas lipídicas, para fins de obtenção de produtos medicinais (terapêutica e/ou diagnóstico), cosméticos e alimentícios. Sendo possível o encapsulamento de um ou mais composto ativo lipossolúvel, mastambém hidrossolúvel. As nanopartículas lipídicas podem ou não ser pegladas e ou terem marcadores específicos, e apresentam as possibilidades de vantagens próprias de nanopartículas lipídicas, como: possibilidade de aumento da biodisponibilidade e estabilidade de ativos muito instáveis, incremento da solubilidade de compostos ativos lipofílicos, liberação controlada do composto ativo, redução da variabilidade de absorção, redução da toxicidade, aumento da eficácia e melhoria das características organolépticas (İlner and Yener, 2007, Severino et al., 2012, Muchow et al., 2008). Para além disso podem ser usadas por administração intravenosa, intramuscular, oral, retal, ocular ou dérmica, tal como já foi referido acima no documento.

As nanopartículas lipídicas são também consideradas portadores promissores de ingredientes ativos com fins cosméticos, uma vez que permitem: proteção dos compostos instáveis contra a degradação química, por exemplo, retinóides (Volkhard Jennings, 2001); libertação do ingrediente ativo de uma forma controlada; funcionar como complexos de oclusão; serem usados como bloqueadores de UV, capazes de funcionar por si só como protetores solares ou em combinação com outras substâncias (Wissing and Muller, 2003).

As novas dietas emergentes relacionadas com o intuito de melhorar a saúde, de forma a prevenir/combater doenças do sistema circulatório, a obesidade, a hipertensão ou o cancro levaram à incorporação de compostos bioativos na indústria alimentar. De facto, ensaios clínicos confirmaram já os benefícios para a saúde de incluir componentes bioativos na dieta diária (Alissa and Ferns, 2012, Ellwood et al., 2014). No entanto, muitos desses componentes benéficos são altamente lipofílicos, possuam uma baixa absorção, limitada biodisponibilidade no organismo humano e são muito instáveis. Isto, verifica-se em várias classes de componentes bioativos, tais como os carotenóides, que são praticamente insolúveis em água. Neste sentido, a inclusão deste tipo de composto em produtos alimentares apresenta-se como um desafio que pode ser ultrapassado pela incorporação destes compostos em partículas lipídicas (Weiss et al., 2008).

Têm-se verificado, nos últimos anos, a tendência de incorporar compostos bioativos também em tecidos, havendo muitos que chegaram mesmo já ser comercializados, tais como compostos e anti-celulíticos em calças de ganga. Também nesta área a incorporação deste tipo de compostos em nanopartículas lipídicas pode prevenir a sua degradação e aumentar a permeabilidade através da pele. De fato, uma investigação muito recente demonstrou o potencial das partículas lipídicas para serem usadas como "patches" para direcionamento seletivo e morte de células cancerígenas (Sempkowski et al., 2016), tendo como potencial aplicação futura, a sua incorporação em têxteis.

REFERÊNCIAS

- ALISSA, E. M. & FERNS, G. A. 2012. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 16.
- ATTAMA, A. A. & MÜLLER-GOYMANN, C. C. 2008. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315, 189-195.
- BATTAGLIA, L. & GALLARATE, M. 2012. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9, 497-508.
- BLASI, P. et al. 2007. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 454-477.
- BONDÌ, M. L., CRAPARO, E. F., GIAMMONA, G., CERVELLO, M., AZZOLINA, A., DIANA, P., MARTORANA, A. & CIRRINCIONE, G. 2007. Nanostructured Lipid Carriers- Containing Anticancer Compounds: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *Drug Delivery*, 14, 61-67.
- BRIOSCHI, A., ZENGA, F., ZARA, G. P., GASCO, M. R., DUCATI, A. & MAURO, A. 2007. Solid lipid nanoparticles: could they help to improve the efficacy of pharmacologic treatments for brain tumors? *Neurological Research*, 29, 324-330.
- BROADWATER, S. J., ROTH, S. L., PRICE, K. E., KOBASLU, M. & MCQUADE, D. T. 2005. *One-pot* multi-step synthesis: a challenge spawning innovation. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 2899-2906.
- DAS, S. & CHAUDHURY, A. 2011. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, 12, 62-76.
- DUNN, S. S., BECKFORD VERA, D. R., BENHABBOUR, S. R., PARROTT, M. C. 2017. Rapid microwave-assisted synthesis of sub-30 nm lipid nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 488, 240-245.
- ELLWOOD, K., BALENTINE, D. A., DWYER, J. T., ERDMAN, J. W., GAINE, P. C. & KWIK-URIBE, C. L. 2014. Considerations on an Approach for Establishing a Framework for Bioactive Food Components. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 5, 693-701. GASCO,

- M., SAETTONE, M. & ZARA, G. 2006a. Pharmaceutical compositions suitable for the treatment of ophthalmic diseases. USA patent application US 10/533,512.
- GASCO, M., SAETTONE, M. & ZARA, G. 2006b. Pharmaceutical compositions suitable for the treatment of ophthalmic diseases. USA patent application US 10/533,512.
- H. MULLER, R., SHEGOKAR, R. & M. KECK, C. 2011. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. *Current Drug Discovery Technologies*, 8, 207-227.
- ICH 2000. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients - Q7 http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf: International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- ICH 2005. Quality Risk Management Q9. In: ICH (ed.). International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- ICH 2009a. pharmaceutical development - Q8(R2). In: ICH (ed.). International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- ICH 2009b. Pharmaceutical Quality System - Q10. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/..../Guidances/ucm073517.pdf>: International conference on harmonisation of technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- JEE, J.-P., UM, S.-J., PARK, J.-S. & KIM, C.-K. 2006. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63, 134-139.
- KINNAN, M. K. & SCHREUDER-GIBSON, H. L. 2014. Nanoparticle entrapment of materials. USA patent application US 13/342,274.
- KRITI SONI, B. K. K., MANAVI KAPUR, KANCHAN KOHLI 2015. Lipid Nanoparticles: Future of Oral Drug Delivery and their Current Trends and Regulatory Issues. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7, 1-18.
- KÜCHLER, S., RADOWSKI, M. R., BLASCHKE, T., DATHE, M., PLENDL, J., HAAG, R., SCHÄFER-KORTING, M. & KRAMER, K. D. 2009. Nanoparticles for skin penetration enhancement - A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 243-250.
- LACATUSU IOANA, BADEA MARIA NICOLETA, LIANE GLORIA RALUCA STAN, HANGANU ANAMARIA & AURÉLIA, M. 2013. Antioxidant lipid nanoparticles and process for obtaining the same. RO20110001431 20111222
- LIU, J. et al. 2008. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 333-344.
- MARCATO, P. D. D. 2009. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia [Online]*, 6.
- MARTINS, S., SARMENTO B FAU - FERREIRA, D. C, FERREIRA DC FAU - SOUTO, E. B. & SOUTO, E. B. 2007. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-- liposomes versus

lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 595-607.

MEHNERT, W. & MÄDER, K. 2001. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 165-196.

MUCHOW, M., MAINCENT, P. & MÜLLER, R. H. 2008. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for Oral Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34, 1394-1405.

MUKHERJEE, S., RAY S FAU - THAKUR, R. S. & THAKUR, R. S. 2009. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 71, 349-358.

MÜLLER, R. H., RADTKE, M. & WISSING, S. A. 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, Supplement, S131-S155.

MÜLLER, R. H., RUNGE, S., RAVELLI, V., MEHNERT, W., THÜLLEMANN, A. F. & SOUTO, E. B. 2006. Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles (SLN[®]) versus drug nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics*, 317, 82-89.

PADOIS, K., PIROT, F. & FALSON, F. 2012. Solid lipid nanoparticles encapsulating minoxidil, and aqueous suspension containing same. França patent application EP20100715993.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A. & MÜLLER, R. H. 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366, 170-184.

PENKLER, L. J., MÜLLER, R. H., RUNGE, S. A. & RAVELLI, V. 2003. Pharmaceutical cyclosporin formulation with improved biopharmaceutical properties, improved physical quality and greater stability, and method for producing said formulation. US 09/674,417.

PRIANO, L. et al. 2007. Solid lipid nanoparticles incorporating melatonin as new model for sustained oral and transdermal delivery systems. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 7(10), 3596-3601.

RIGON, R. B., FACHINETTI, N., CHORILLI, M., SEVERINO, P. & SANTANA, M. H. A. 2016. Processo de obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas lipídicas sólidas e seu uso. Brasil patent application.

SACHDEVA, M. S. & PATLOLLA, R. 2014. Nanoparticle formulations for skin delivery. US 12/433,344.

SARMENTO, B., MARTINS, S., FERREIRA, D. & SOUTO, E. B. 2007. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 743-749. [350]

SEMPKOWSKI, M., ZHU, C., MENZENSKI, M. Z., KEVREKIDIS, I. G., BRUCHERTSEIFER, F., MORGENSTERN, A. & SOFOU, S. 2016. Sticky Patches on Lipid Nanoparticles Enable the Selective Targeting and Killing of Untargetable Cancer Cells. *Langmuir*, 32, 8329-8338.

SEVERINO, P., ANDREANI, T., MACEDO, A. S., FANGUEIRO, J. F., SANTANA, M. H. A., SILVA, A. M.

- & SOUTO, E. B. 2012. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*, 10.
- SHAH, R.M., ELDRIDGE, D.S., PALOMBO, E.A., HARDING, I.H. 2016. Microwave-assisted formulation of solid lipid nanoparticles loaded with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1-2), 543-554.
- SHAH, R.M., BRYANT, G., TAYLOR, M., ELDRIDGE, D.S., PALOMBO, E.A., HARDING, I.H. 2016. Structure of solid lipid nanoparticles produced by a microwave-assisted microemulsion technique. *RSC ADVANCES*, 6, 36803-36810.
- UGAZIO, E., CAVALLI, R. & GASCO, M. R. 2002. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 241, 341-344.
- LINER, M. & YENER, G. 2007. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 289-300.
- VENKATARAMAN, C. & PAWAR, A. A. 2013. Method and a system for producing thermolabile nanoparticles with controlled properties and nanoparticles matrices made thereby. India patent application US 13/554,798.
- VOLKHARD JENNING, S. H. G. 2001. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Microencapsulation*, 18, 149-158.
- WEISS, J., DECKER, E. A., MCCLEMENTS, D. J., KRISTBERGSSON, K., HELGASON, T. & AWAD, T. 2008. Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components. *Food Biophysics*, 3, 146-154.
- WISSING, S. A., KAYSER, O. & MÜLLER, R. H. 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1257-1272.
- WISSING, S. A. & MÜLLER, R. H. 2003. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 254, 65-68.
- XIANG, Q. et al. 2007. Lung-targeting delivery of dexamethasone acetate loaded solid lipid nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research*, 30(4), 519-525.
- YEVHENIIVNA, Y. D., IVANIVNA, S. N., VALERIIVNA, B. O. & VASYLIOVYCH, S. O. 2013. Method for producing solid nanoparticles UA20120013366U 20121123
- YUAN, H., CHEN J FAU - DU, Y.-Z., DU YZ FAU - HU, F.-Q., HU FQ FAU - ZENG, S., ZENG S FAU - ZHAO, H.-L. & ZHAO, H. L. 2007. Studies on oral absorption of stearic acid SLN by a novel fluorometric method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58, 157-164.
- ZHANG, Q., WANG, J., GUO, Y., ZHANG, X., JIA, Z., LIN, P., ZHANG, J. & ZHANG, J. 2011a. Ph-sensitive solid pharmaceutical composition for oral preparation and preparation method thereof. Google Patents.
- ZHANG, Q., WANG, J., GUO, Y., ZHANG, X., JIA, Z., LIN, P., ZHANG, J. & ZHANG, J. 2011b. Ph-sensitive solid pharmaceutical composition for oral preparation and preparation method thereof. US 12/812,687.

冯年平;; 刘颖;; ZEifl;; 谭蓉; & 陈志强. 2010. Nanostructured lipid carrier, preparation method and application thereof. CN 201010224865.

周亚¾ -E., E 汀. 2011. Novel preparation method of solid lipid nanoparticles. CN 201010112202.

夏强; & 倪石磊. 2014. Quercetin nanostructu red lipid carrier and preparation method thereof. CN 201410405191.

夏;; 顾宁;; 马全红; & 王¾¾. 2006. Nanomete r preparation of natura l vita min E. CN 200310106518.

强 S , S., 顾宁, ¾¾佳. 2004. Method for preparing nanometre structu re medicine. CN 03152856.

齐宪荣 & 高玮. 2014. Docetaxel preparation and application of lipid nanoparticles. CN 201210287792.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo *one-pot* de síntese por micro-ondas de nanopartículas lipídicas com diâmetro médio de 30 a 900 nm, mais preferencialmente de 60 a 300 nm caracterizado por a síntese das nanopartículas ser realizada por aquecimento com micro-ondas a uma temperatura inferior a 90°C com agitação simultânea contínua, seguida de arrefecimento.
2. Processo de acordo com a reivindicação n^o 1 caracterizado por a síntese das nanopartículas lipídicas compreender:
 - i) colocação do lípido ou mistura de lipídios, surfactantes e, opcionalmente, co-surfactantes, solução aquosa e compostos ativos num tubo de micro-ondas;
 - ii) aquecimento da mistura com energia de micro-ondas, com agitação simultânea;
 - iii) arrefecimento até ser atingida a temperatura ambiente.
3. Processo de acordo com a reivindicação n^o 1 caracterizado por a síntese das nanopartículas lipídicas compreender:
 - i) colocação do lípido ou mistura de lipídios, surfactantes e, opcionalmente, co-surfactantes e compostos ativos num tubo de micro-ondas;
 - ii) aquecimento da mistura com energia de micro-ondas, com agitação simultânea;
 - iii) adição de solução aquosa;
 - iv) aquecimento da mistura com energia de micro-ondas, com agitação simultânea;
 - v) arrefecimento até ser atingida a temperatura ambiente.
4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado pelo aquecimento ser efetuado a uma temperatura igual ou superior à temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, durante 1 a 60 minutos.
5. Processo de acordo com a reivindicação n^o 2 caracterizado pelo aquecimento ser efetuado a uma temperatura de 5 a 20°C superior à temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, durante 5 a 20 minutos.
6. Processo de acordo com a reivindicação n^o 3 caracterizado pelo aquecimento ser efetuado a uma temperatura de 5 a 15°C superior à temperatura de fusão dos constituintes lipídicos, durante 5 a 15 minutos.
7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por o arrefecimento ser realizado sem agitação; com agitação constante até atingir a temperatura ambiente; ou com agitação constante e choque térmico, para arrefecimento parcial ou até atingir a temperatura ambiente, através de arrefecimento programado pelo próprio aparelho micro-ondas, por banho de gelo ou combinação destes.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por a agitação ser de intensidade moderada a vigorosa, preferencialmente de 900rpm.
9. Processo de acordo com a reivindicação anterior caracterizado por a agitação ser efetuada por adição de barra magnética ao tubo de microondas, com uma dimensão o maior possível de forma a permitir uma maior homogeneidade e agitação mais vigorosa.
10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado pelo volume final dos constituintes inseridos no tubo de microondas ser preferencialmente de 1/7 a 1/2 do volume do tubo, para garantir uma completa e controlada homogeneização durante o processo de agitação.
11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por o constituinte lipídico consistir num ou mais componentes selecionados de entre o grupo de ácidos gordos, esteróides, ceras, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos e, opcionalmente, fosfolípidos.
12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por o surfactante ou conjunto de surfactantes ser do tipo não iónico.
13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por o co-surfactante consistir num ou mais componentes selecionados do grupo butanol, hexanodiol, propilenoglicol, hexanol, ácido butírico e hexanóico, ésteres de ácido fosfórico, álcool benzílico.
14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por a solução aquosa ter um pH apropriado, preferencialmente entre 5 e 7, ajustável com soluções tampão, e conter opcionalmente sais, conservantes, antioxidantes, estabilizantes e marcadores.
15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por o lípido ou conjunto de lípidos estarem compreendidos numa proporção entre 1 e 20%, preferencialmente de 1,5 a 8%, do peso total; solução aquosa entre 70 e 96%, preferencialmente de 80 a 95,5%, do peso total; surfactantes de 1 a 20%, preferencialmente de 2 a 15%, do peso total; co-surfactantes entre 0 e 15%, preferencialmente de 0 a 10%, do peso total; e, os compostos ativos entre 0 a 50% dos constituintes lipídicos, preferencialmente de 1 a 15%.
16. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado pela

incorporação de ligantes ou marcadores, específicos a cada formulação, na superfície das nanopartículas lipídicas.

17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por serem obtidas nanopartículas lipídicas com um diâmetro médio de 30 a 900 nm, preferencialmente de 60 a 300 nm, com polidispersão de 0,05 a 0,5, preferencialmente de 0,1 a 0,3, e potencial zeta de 10 a 70 mV, preferencialmente de 20 a 40 mV.
18. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) ou carregadores lipídicos nanoestruturados (NLC) obtidas pelo processo descrito nas reivindicações n^{as} 1 a 17.
19. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) ou carregadores lipídicos nanoestruturados (NLC) de acordo com a reivindicação anterior caracterizadas por terem um diâmetro médio de 30 a 900 nm, preferencialmente de 60 a 300 nm, com polidispersão de 0,05 a 0,5, preferencialmente de 0,1 a 0,3, e potencial zeta de 10 a 70 mV, preferencialmente de 20 a 40 mV.

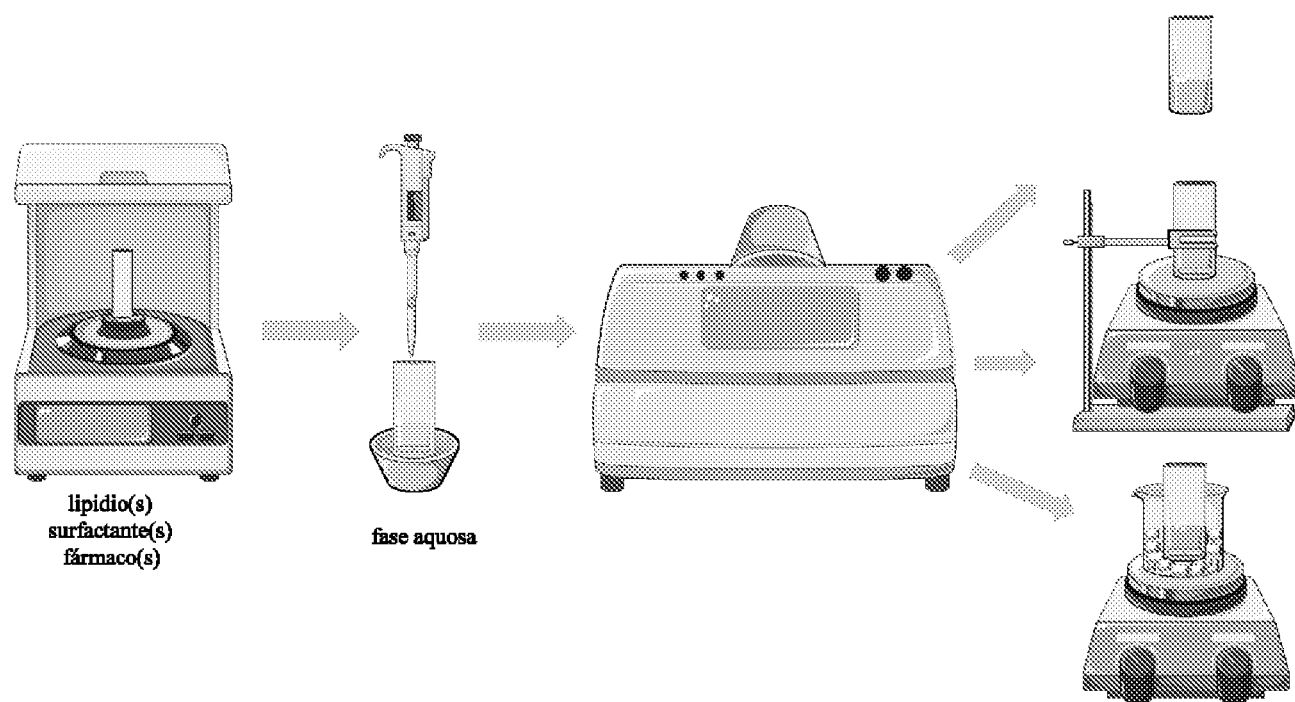


Figura 1A

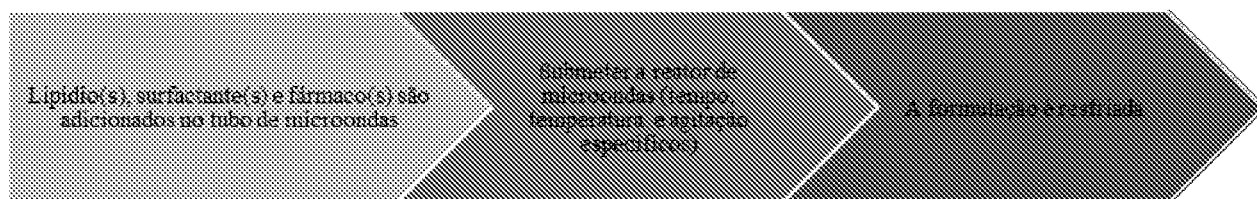


Figura 1B

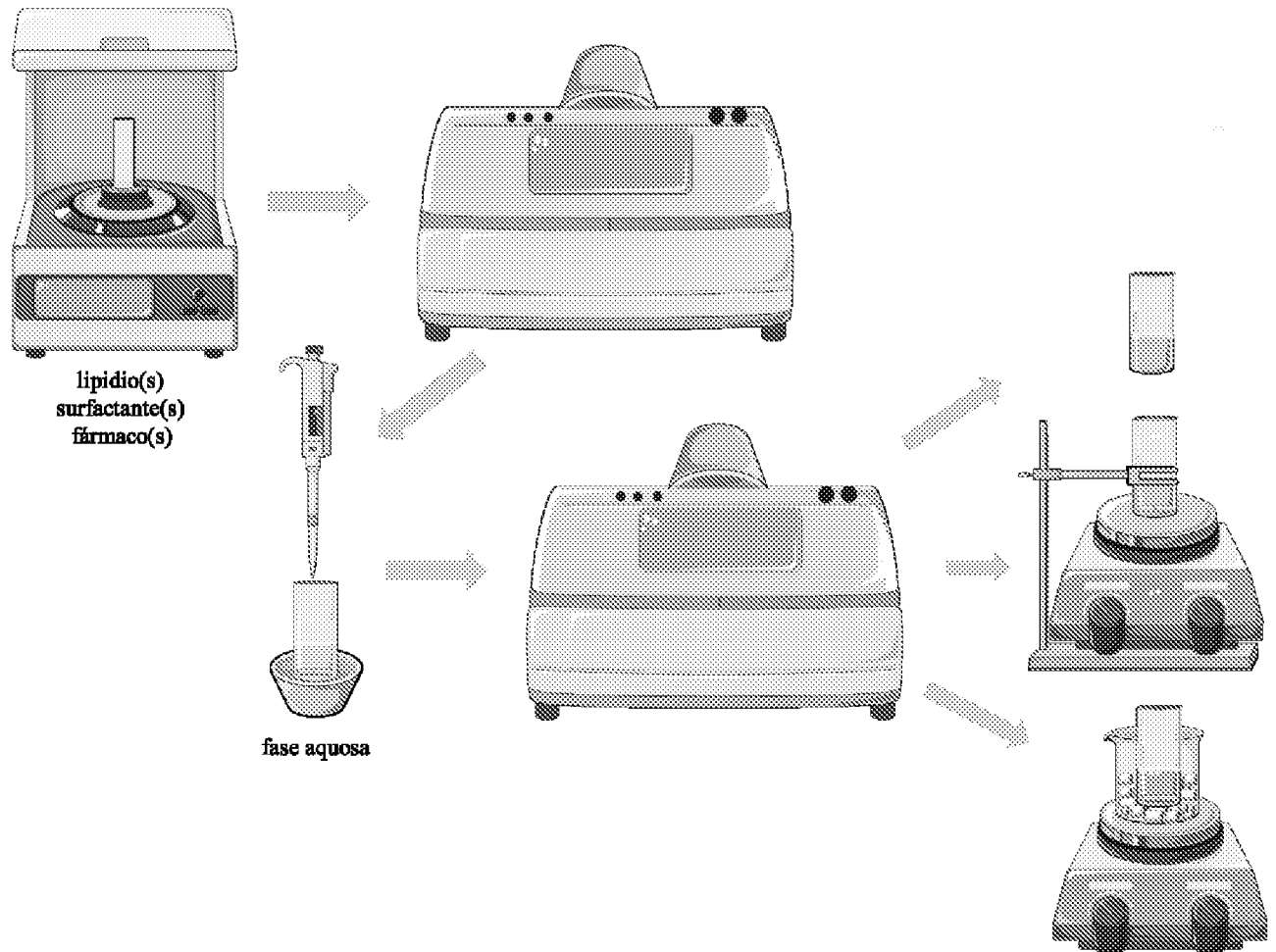


Figura 2A

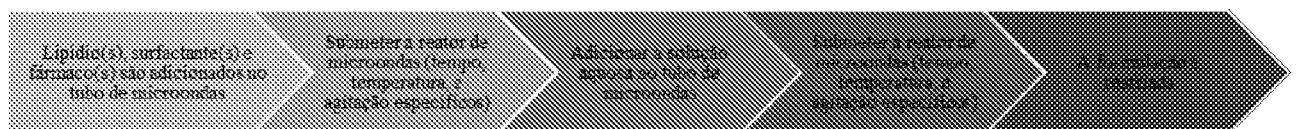


Figura 2B

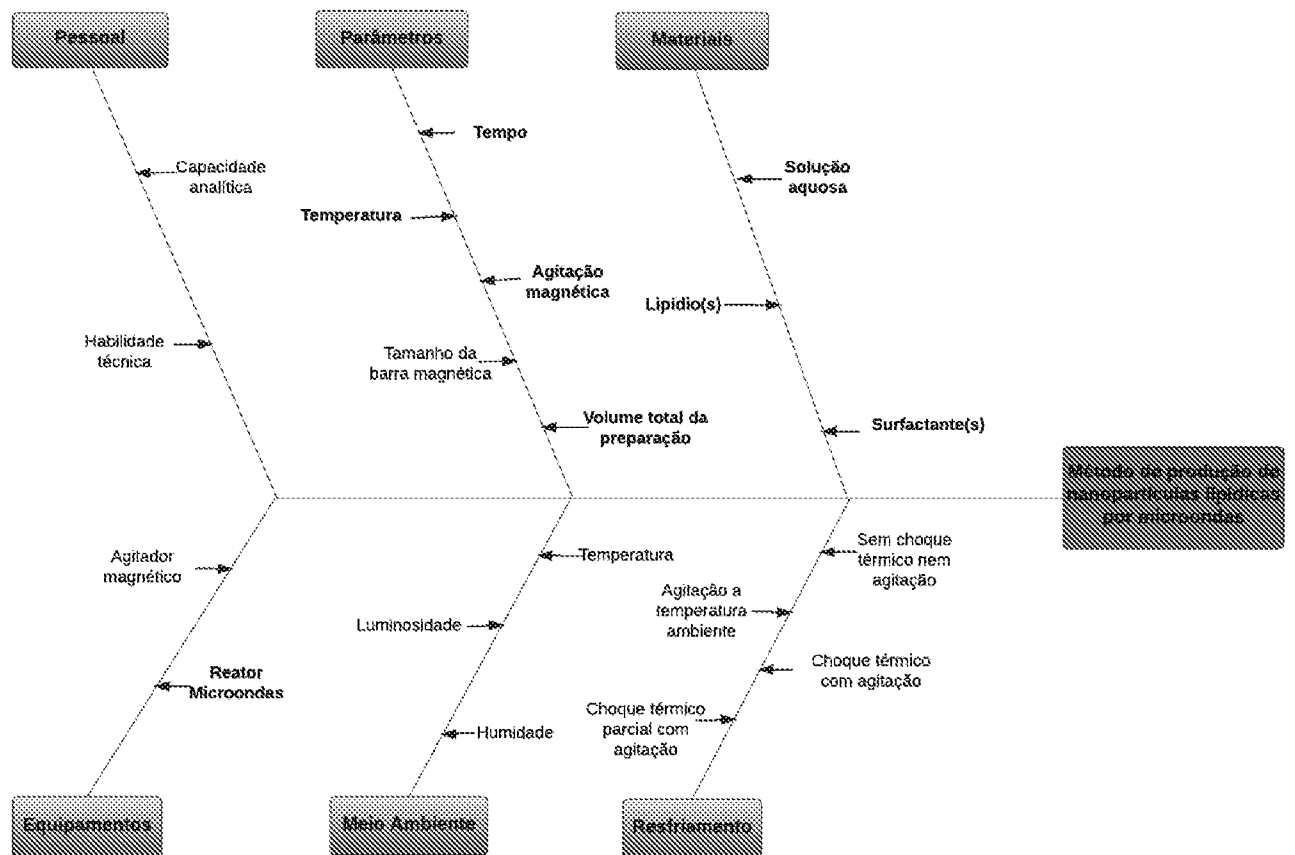


Figura 3

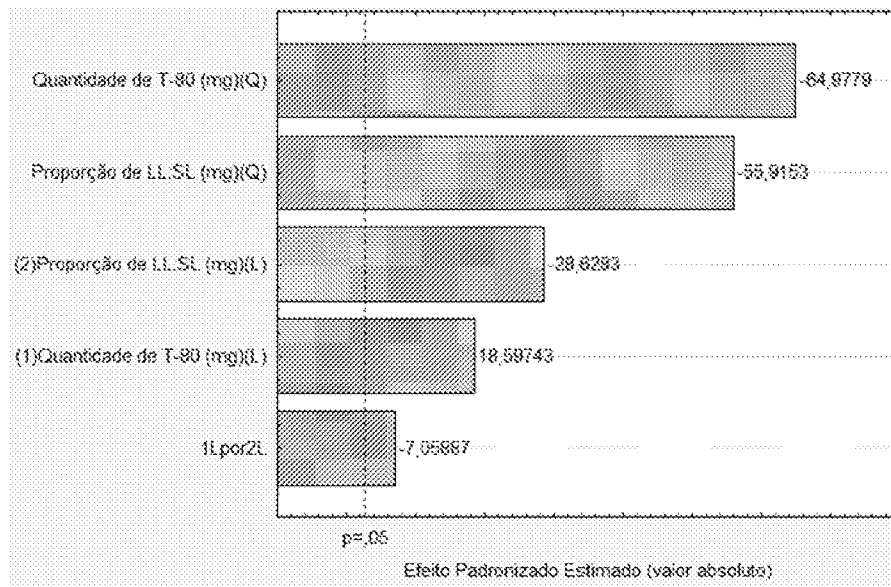


Figura 4A

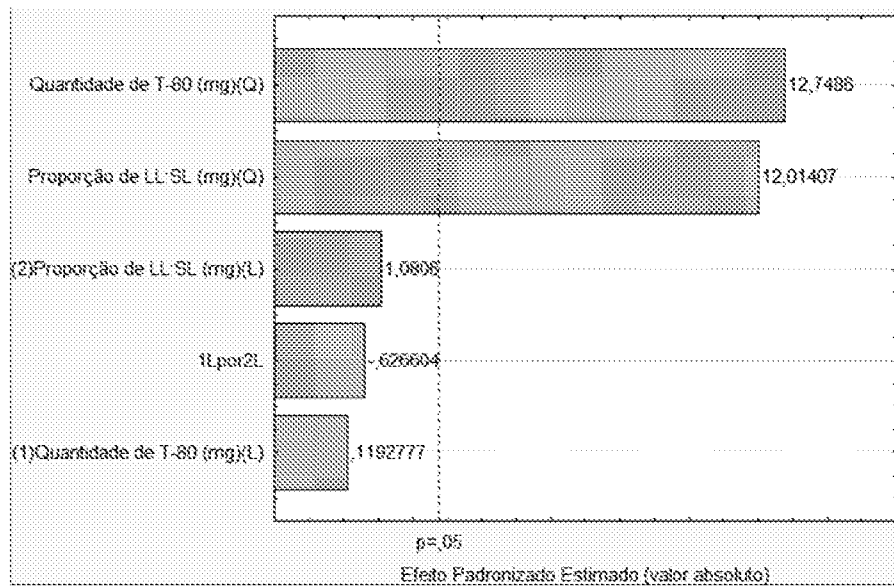


Figura 4B

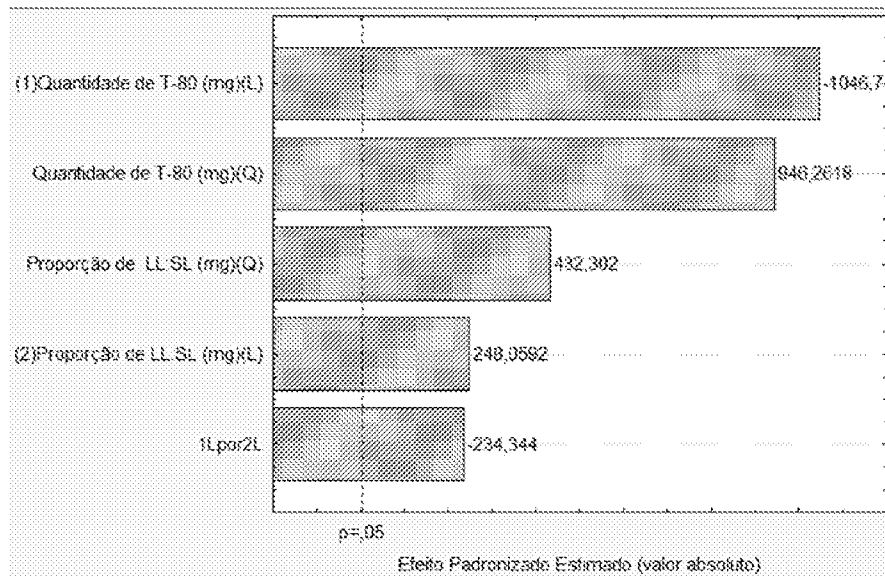


Figura 4C

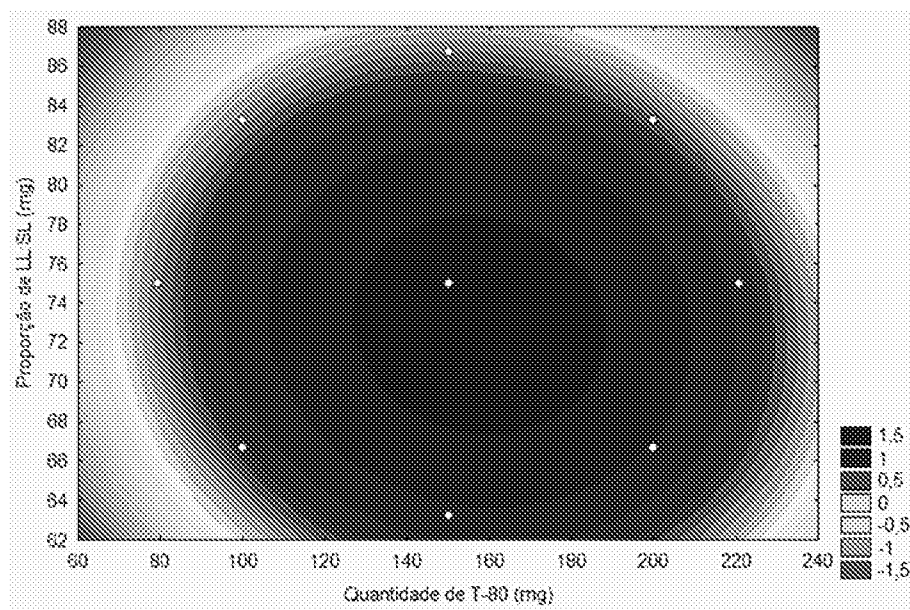


Figura 5A

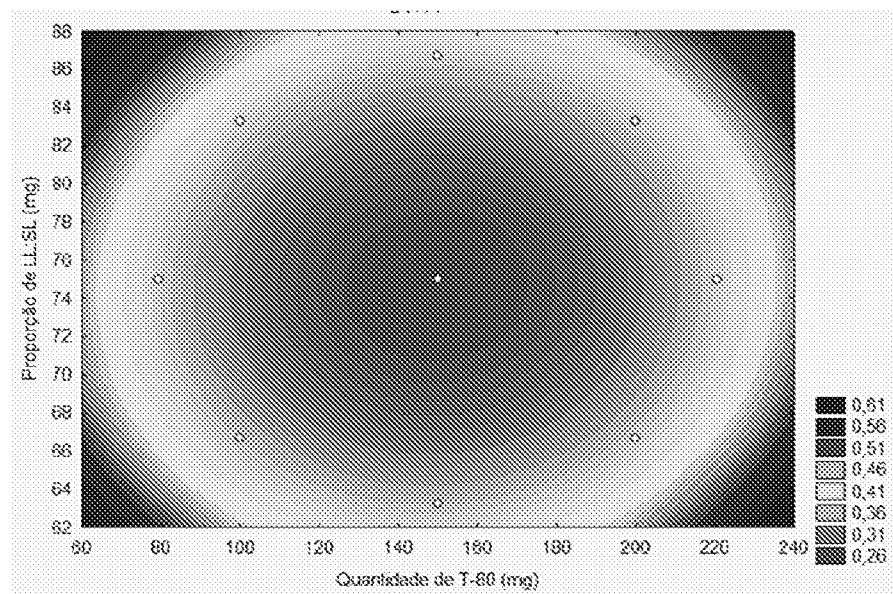


Figura 5B

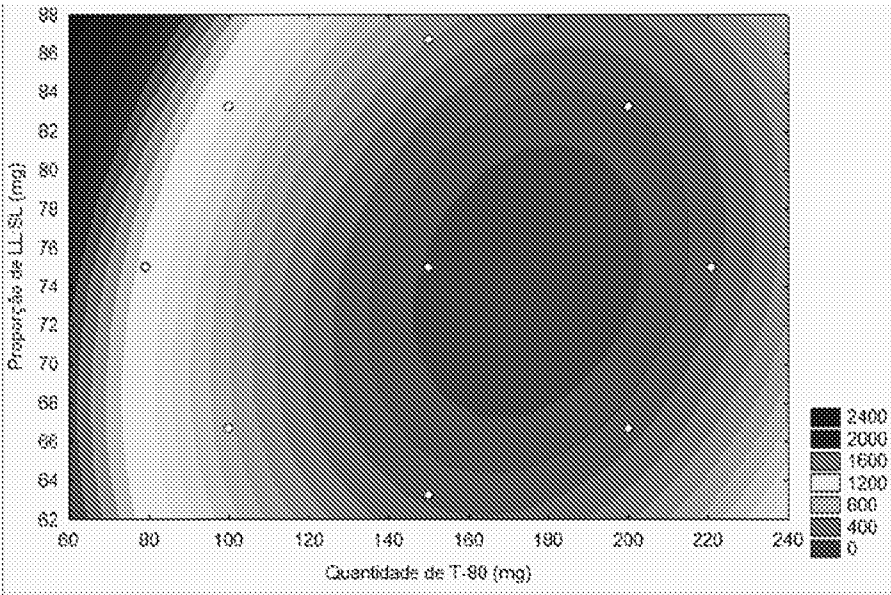


Figura 5C

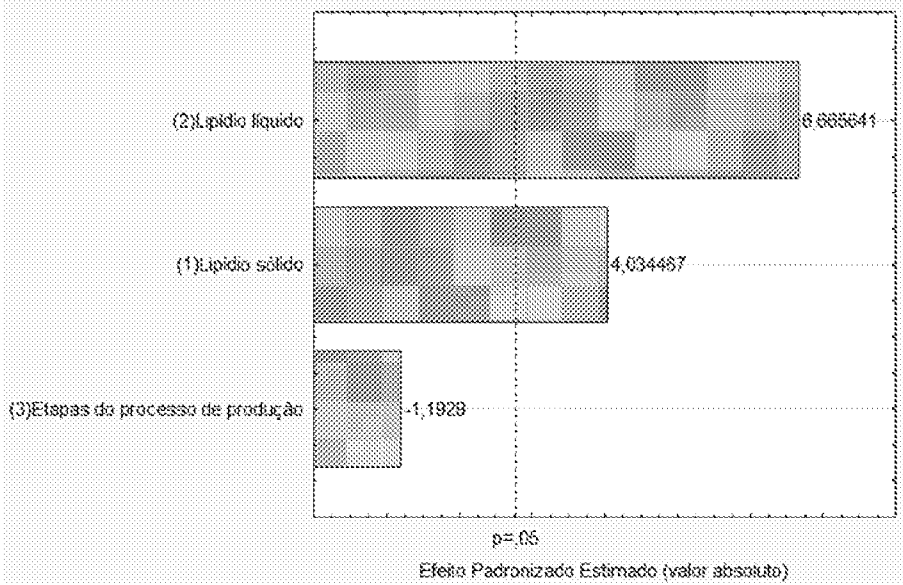


Figura 6^a

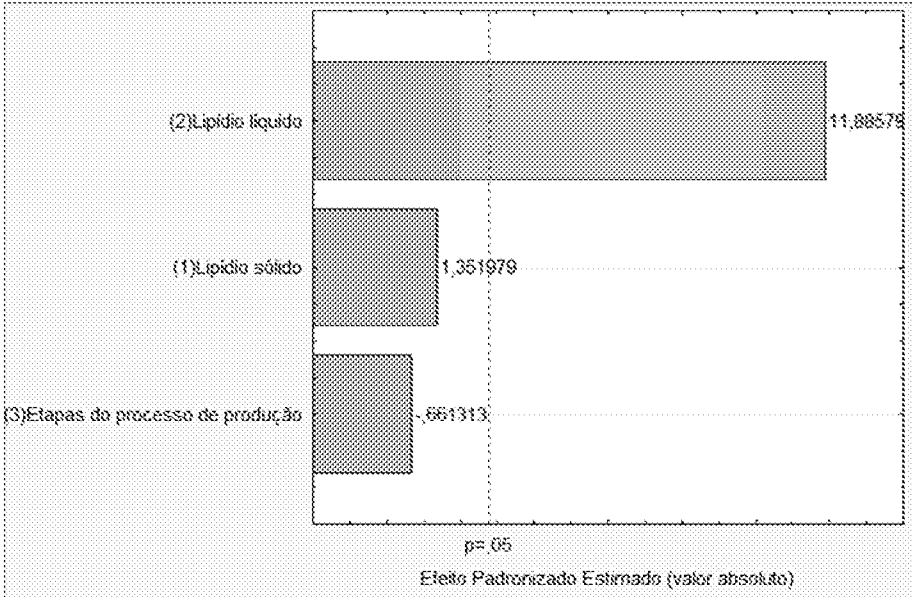


Figura 6B

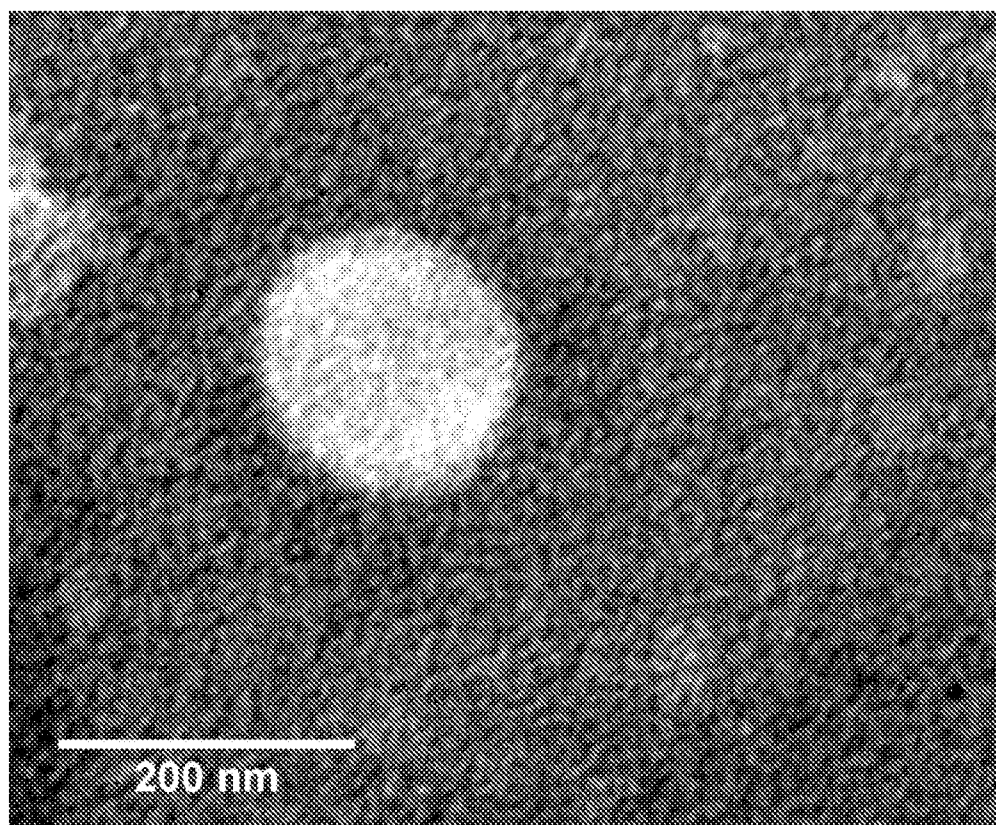


Figura 7A

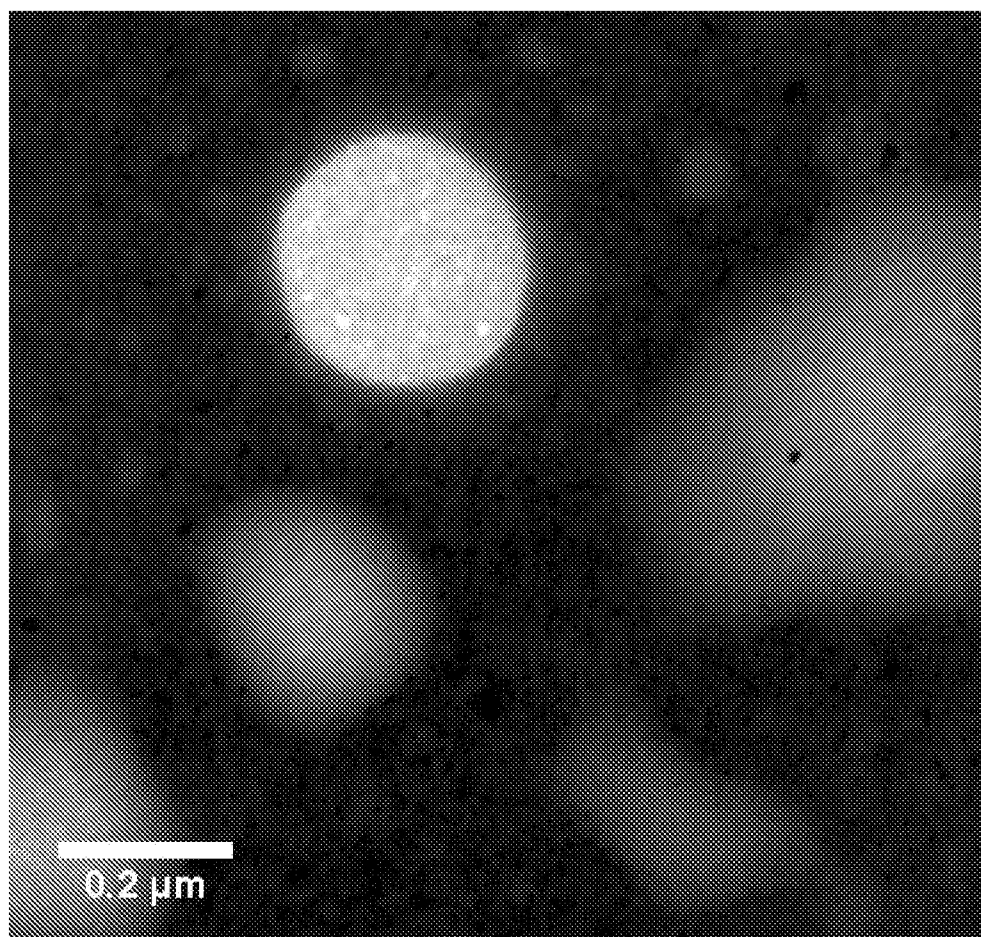


Figura 7B

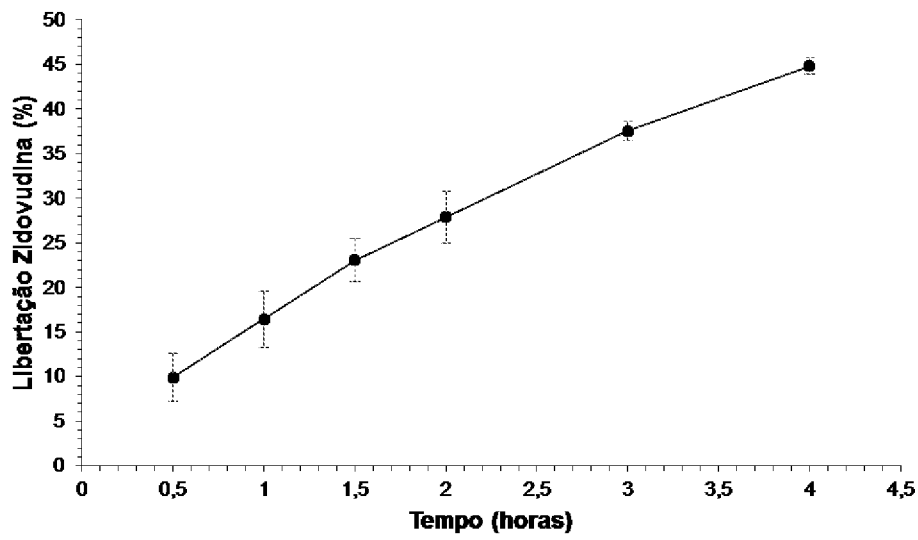


Figura 8A

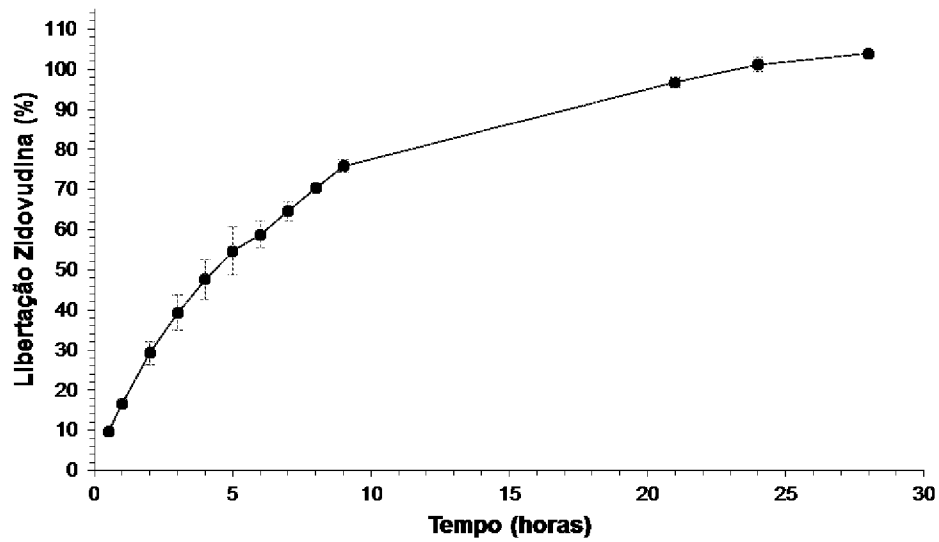


Figura 8B

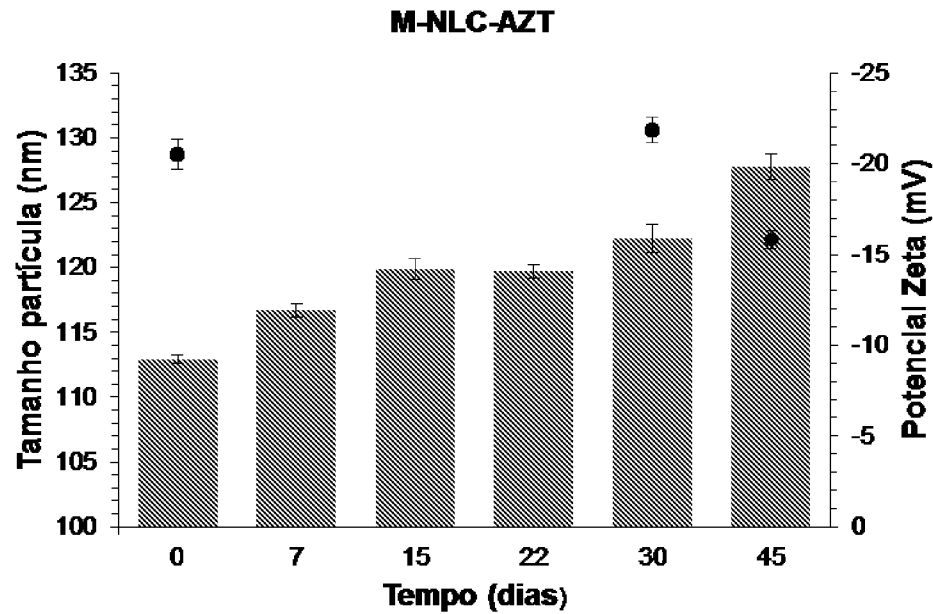


Figura 9A

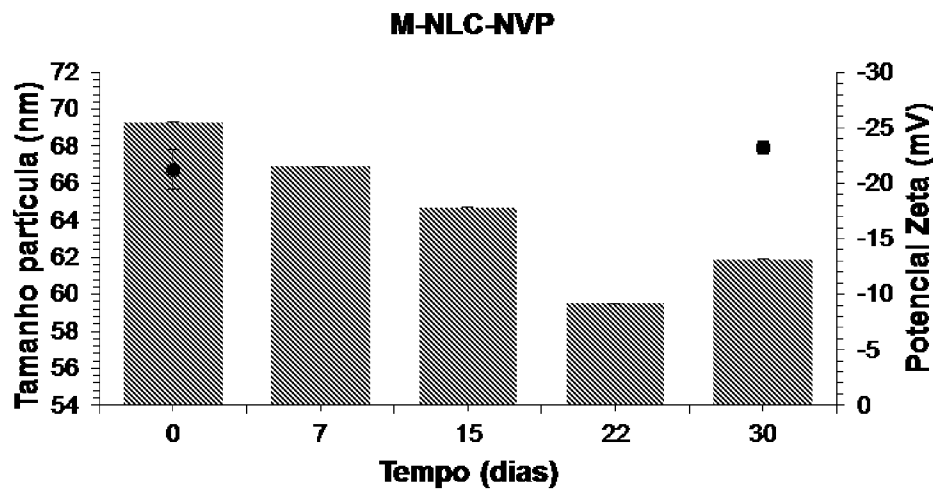


Figura 9B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/057900

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. BO1J13/00 A61K9/51 B01J19/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) into both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
BOU A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal , WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROHAN M. SHAH ET AL: "Microwave-assisted formulation of solid lipid nanoparticles loaded with non-steroidal anti-inflammatory drugs" , INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol . 515 , no. 1-2 , 24 October 2016 (2016-10-24) , pages 543-554, XP055466130, NL ISSN : 0378-5173, DOI : 10.1016/j.ijpharm.2016.10.054 Table 2 Pages 544-545 & 547 ----- - / - -	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2018

Date of mailing of the international search report

18/04/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mc Donnell, Shane

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/057900

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROHAN M. SHAH ET AL: "Encapsulati on of clotrimazole into solid lipid nanoparti cles by mi crowave-assi sted mi croemul sion technique" , APPLI ED MATERIALS TODAY, vol . 5, 13 October 2016 (2016-10-13) , pages 118-127 , XP055466144, ISSN : 2352-9407, DOI : 10. 1016/j .apmt.2016.09.010 Pages 119-120 Table 2	1-19
X	----- SHAH ROHAN M ET AL: "Physi cochemi cal characteri zati on of sol id lipi d nanoparti cles (SLNs) prepared by a novel mi croemul sion technique" , JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCI ENCE,, vol . 428, 4 May 2014 (2014-05-04) , pages 286-294, XP028850061 , ISSN : 0021-9797, DOI : 10. 1016/J .JCIS.2014.04.057 Page 288 Tables 1 (DL A) Fi gures 2&3	1-19
X	----- KALAYCIOGLU GOKCE DICLE ET AL: "Preparati on and investi gation of sol id lipid nanoparti cles for drug del ivery" , COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSIOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, ELSEVI ER, AMSTERDAM, NL, vol . 510, 21 June 2016 (2016-06-21) , pages 77-86, XP029780652, ISSN : 0927-7757, DOI : 10. 1016/J .COLSURFA.2016.06.034	18, 19
A	Table 1 -----	1-17

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional N°

PCT/IB20 17/057900

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

INV. B01J 13/00 A61K9/51 BQ1J19/12

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

BOU A61K

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	ROHAN M. SHAH ET AL: "Microwave assisted formulation of solid lipid nanoparticles loaded with non-steroidal anti-inflammatory drugs", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 515, no. 1-2, 24 Outubro 2016 (2016-10-24), pages 543-554, XP055466 130, NL ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.10.054 mesa 2 páginas 544-545 & 547 ----- - / -	1-19



Documentos adicionais estão listados na continuação do Quadro C

Ver o anexo de família da patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" depósito ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional.

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial (como especificado).

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

11 Abril 2018

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

18/04/2018

Nome e endereço da ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

N° de fax:

Funcionário autorizado

N° de telefone:

Categoria*	Citação do documento com indicação de partes relevantes, quando apropriado	Relevante para as reivindicações N°
X	ROHAN M. SHAH ET AL: "Encapsulation of clotrimazole into solid lipid nanoparticles by microwave-assisted microemulsion technique" , APPLIED MATERIALS TODAY, vol . 5, 13 Outubro 2016 (2016-10-13) , páginas H8-127, XP055466144, ISSN: 2352-9407, DOI : 10.1016/j.apmt.2016.09.010 páginas 119-120 mesa 2	1-19
X	----- SHAH ROHAN M ET AL: "Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique" , páginas JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, vol . 428, 4 May 2014 (2014-05-04) , 286-294, XP028850061, ISSN: 0021-9797, DOI : 10.1016/J.JCIS.2014.04.057 página 288 mesa 1 (DL A) Figuras 2&3	1-19
X	----- KALAYCIOGLU GOKCE DICLE ET AL: "Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery" , COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol . 510, 21 June 2016 (2016-06-21) , páginas 77-86, XP029780652 , ISSN: 0927-7757, DOI : 10.1016/J.COLSURFA.2016.06.034	18, 19
A	----- mesa 1	1-17