



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015024240-9 A2

(22) Data do Depósito: 21/09/2015

(43) Data da Publicação: 28/03/2017



\* B R 1 0 2 0 1 5 0 2 4 2 4 0 A

**(54) Título:** CARREADORES LIPÍDICOS DE TAMANHO NANOMÉTRICO COMPREENDENDO FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE ISOFLAVONAS AGLICONAS DA SOJA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS MESMOS E FORMULAÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS

**(51) Int. Cl.:** A61K 9/51; A61K 31/366; A61K 47/22

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**(72) Inventor(es):** MARINA CARDOSO NEMITZ; DÉBORA F. ARGENTA; FERNANDA BRUXEL; LETÍCIA SCHERER KOESTER; GILSANE LINO VON POSER; VALQUÍRIA LINCK BASSANI; HELDER FERREIRA TEIXEIRA

**(57) Resumo:** Resumo CARREADORES LIPÍDICOS DE TAMANHO NANOMÉTRICO COMPREENDENDO FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE ISOFLAVONAS AGLICONAS DA SOJA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS MESMOS E FORMULAÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS A presente invenção descreve carreadores lipídicos de diâmetro médio de gotícula/partícula inferior a 1,0 micrômetro compreendendo uma fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja para uso alimentar, farmacêutico e/ou cosmético. A presente invenção também descreve os processos de obtenção das nanoestruturas por processo de mistura de uma fase orgânica e uma fase oleosa sob agitação, com posterior evaporação do solvente orgânico, e etapa final de homogeneização à alta pressão. As formulações compreendem tais nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados.

CARREADORES LIPÍDICOS DE TAMANHO NANOMÉTRICO COMPREENDENDO FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE ISOFLAVONAS AGLICONAS DA SOJA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS MESMOS E FORMULAÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS

**Campo da Invenção**

[001] A presente invenção descreve carreadores lipídicos de tamanho nanométrico (< 1,0 micrômetro) compreendendo uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas da soja, processos de obtenção dos mesmos e formulações que compreendem tais carreadores. A tecnologia pertence ao campo da nanotecnologia e consiste em formulações aquosas que podem ser utilizadas na área alimentar, farmacêutica e cosmética.

**Antecedentes da Invenção**

[002] A soja, *Glycine max* L. Merr, é uma leguminosa amplamente cultivada em diversos países, e apresenta, devido a isso, grande impacto na economia mundial. O seu cultivo está voltado principalmente para a produção de alimentos, contudo diversas áreas industriais tem mostrado interesse crescente nos subprodutos que seus grãos podem originar (CHEN, K.I., et al.; "Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications". Applied Microbiology and Biotechnology 2012, v. 96, p. 9–22).

[003] As sementes da soja são constituídas basicamente por óleo, proteínas, carboidratos, minerais, e metabólitos secundários tais como polifenóis, destacando-se as isoflavonas e saponinas. Dentre as diversas substâncias químicas encontradas nesta planta, as isoflavonas apresentam amplo interesse clínico, devido principalmente à semelhança estrutural com o hormônio 17- $\beta$ -estradiol (NEMITZ, M.C., et al.; "Bioactive soy isoflavones: extraction and purification procedures, potential dermal use and nanotechnology-based delivery systems". Phytochemistry Reviews (*In press*), 2014, DOI: 10.1007/s11101-014-9382-0).

[004] As isoflavonas constituem um grupo de fitoestrógenos de amplo

interesse na área médica e nutricional. Tais compostos são encontrados em maior quantidade nos grãos e produtos de soja, podendo ser obtidos por processos de extração e purificação, ou ainda, adquiridos comercialmente nas suas formas sintéticas.

**[005]** As agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína são as formas das isoflavonas consideradas com maior capacidade de absorção tanto no trato gastro-intestinal quanto na pele, além de apresentarem maior potencial terapêutico quando comparadas às formas conjugadas. A obtenção destas substâncias pode ser realizada por diferentes maneiras, tais como aquisição comercial das suas formas isoladas e sintéticas, ou ainda obtidas a partir de extratos de materiais vegetais. A extração de grãos seguida de procedimento de hidrólise e purificação tem sido a metodologia mais descrita para a obtenção das principais isoflavonas agliconas a partir da soja (NEMITZ, M.C., et al.; “Bioactive soy isoflavones: extraction and purification procedures, potential dermal use and nanotechnology-based delivery systems”. *Phytochemistry Reviews (In press)*, 2014, DOI: 10.1007/s11101-014-9382-0; ROSTAGNO, M., et al.; “Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods”. *J Chromatogr A*, 2009, v. 1216, p. 2–29).

**[006]** Produtos das áreas alimentar, farmacêutica e cosmética contendo isoflavonas isoladas, ou ainda extratos de soja, são relatados na literatura científica, bem como encontrados no portfolio de indústrias da área da saúde. No entanto, estudos apontam que o extrato de soja possui maior capacidade de inibição do crescimento de tumores quando comparado a isoflavonas isoladas, e que o uso simultâneo das diferentes formas de isoflavonas pode potencializar a ação estrogênica e fotoprotetora das mesmas. Desta forma, extratos de soja e seus derivados, tais como frações purificadas contendo diferentes isoflavonas, são altamente promissores para a fabricação de produtos da saúde (IOVINE, B., et al.; “Synergic effect of genistein and daidzein on UVB-induced DNA damage: an effective photoprotective combination”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, v. 2011, p. 1–8; KIM, H-A., et

al.; “Soy extract is more potent than genistein on tumor growth inhibition”. *Anticancer Research*, 2008, v. 28, p. 2837–2842; HSU, A., et al.; “Differential effects of whole soy extract and soy isoflavones on apoptosis in prostate cancer cells”. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 2010, v. 235, n. 1, p. 90–97; RANDO, G., et al.; “A. Differential effect of pure isoflavones and soymilk on estrogen receptor activity in mice”. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, v. 237, p. 288–297).

**[007]** Contudo, quando os extratos apresentam as isoflavonas nas suas formas de agliconas, alguns desafios podem ser encontrados durante a fabricação de produtos terapêuticos ou alimentares devido à baixa hidrossolubilidade das isoflavonas agliconas e a alta taxa de amargor das mesmas (ALDIN, E. et al.; “Bitterness of soy extracts containing isoflavones and saponins”. *Journal of food Science*, 2006, v. 71, n. 3, p. S211–S215; LARKIN, T.A, et al.; “The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, v. 48, n. 6, p. 538–552).

**[008]** Para contornar as limitações de incorporação de princípios ativos de caráter amargo ou hidrofóbicos em formulações aquosas, algumas alternativas são encontradas. Neste sentido, a nanotecnologia aplicada a ingredientes vegetais tem experimentado um rápido crescimento, com diversas aplicações inovadoras na área da saúde. Dentre algumas vantagens, destaca-se que o uso de nanocarreadores lipídicos permite a incorporação de substâncias hidrofílicas e/ou hidrofóbicas em formulações aquosas e possibilita o mascaramento de sabores desagradáveis de certas substâncias ativas, além de aumentar a estabilidade das substâncias incorporadas, e potencializar a permeabilidade dos ativos nas barreiras biológicas (FATHIA, M., et al.; “Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems”. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, v. 23, p. 13–27).

**[009]** Desta forma, considerando o sabor amargo e a baixa hidrossolubilidade das isoflavonas agliconas, juntamente com as vantagens

do uso de sistemas nanométricos na administração de substâncias de origem vegetal, e as potencialidades biológicas da administração simultânea de genisteína, daidzeína e gliciteína, a presente invenção refere-se a formulações aquosas compreendendo fração enriquecida em isoflavonas agliconas da soja em carreadores lipídicos de diâmetro médio de gotícula/partícula inferior a 1,0 micrômetro. Os nanocarreadores lipídicos da presente invenção são caracterizados por compreenderem nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados. O processo de fabricação dos produtos é caracterizado por compreender uma etapa de homogeneização a alta pressão, a fim de produzir carreadores lipídicos nanométricos de tamanhos uniformes e por não apresentar em sua formulação final a presença de solventes orgânicos.

**[0010]**O uso de nanocarreadores lipídicos contendo isoflavonas agliconas é descrito na literatura científica e em algumas patentes. Porém, conforme descrito logo abaixo, nenhuma tecnologia se assemelha ao conteúdo da presente invenção.

**[0011]**A incorporação da daidzeína a lipossomas foi realizada por Dwiecki et al. (2009) pelo método de hidratação de filme lipídico (DWIECKI, K., et al.; “Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, v. 96, p. 242–248). A presente invenção emprega um método distinto de preparo dos lipossomas e incorpora uma fração enriquecida em isoflavonas da soja.

**[0012]**A incorporação da genisteína a nanoemulsões foi realizada por Silva et al. (2009) e Argenta et al. (2014) pelo método de emulsificação espontânea (SILVA, A.P.C., et al.; “Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein”. *Die Pharmazie*, 2009, v. 64, p. 32–35; ARGENTA, D. F., et al.; “Factorial design applied to the optimization of lipid composition of topical antiherpetic nanoemulsions containing isoflavone genistein”. *International*

Journal of Nanomedicine, 2014, v. 9, p. 4737–4747). A presente invenção emprega um método distinto de preparo das nanoemulsões e incorpora uma fração enriquecida em isoflavonas da soja.

**[0013]**A incorporação de genisteína a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foi realizada por Zhang et al. (2013) pelo método de emulsificação por fusão combinado com a técnica de ultra-sonicação, e por Andrade et al. (2014) pelo método de microemulsão (ZHANG, W., et al.; “Design, characterization, and in vitro cellular inhibition and uptake of optimized genistein-loaded NLC for the prevention of posterior capsular opacification using response surface methodology”. International Journal of Pharmaceutics, 2013, v. 454, p. 354–366; ANDRADE, L.M., et al.; “Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles”. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014, v. 88, p. 40–47). A presente invenção emprega um método distinto de preparo das NLS e incorpora uma fração enriquecida em isoflavonas da soja.

**[0014]**A incorporação de genisteína em nanocápsulas foi realizada por Zampieri et al. (2013) pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (ZAMPIERI, A.L.T.C., et al.; “Biodegradable polymeric nanocapsules based on poly(DL-lactide) for genistein topical delivery: obtention, characterization and skin permeation studies”. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2013, v. 9, p. 527–534). A presente invenção não utiliza polímeros, diferindo, portanto, de tal documento.

**[0015]**A incorporação de daidzeína em nanocarreadores lipídicos foi previamente descrita por Zhang et al. (2011), onde a substância foi complexada a um fosfolipídio e, após, o complexo foi encapsulado a NLS pelo processo de homogeneização de filme (ZHANG, Z., et al.; “Daidzein–phospholipid complex loaded lipid nanocarriers improved oral absorption: in vitro characteristics and in vivo behavior in rats”. Nanoscale., 2011, v. 3, n. 4, p. 1780–1787). A presente invenção incorpora fração enriquecida em isoflavonas e não utiliza uma etapa de complexação, diferindo, portanto, de tal documento.

**[0016]**As diferentes tecnologias protegidas pelos números US8551530 (B2), 15/11/2010, “Nanoparticle isoflavone composition & methods of making the same”, WO2007000193 (A1), 31/01/2006, “Isoflavone nanoparticles and use thereof” e CN103211750 (A), 04/01/2013, “Method of preparing soy isoflavone nanoparticles by precipitation with compressed antisolvent (PCA) using a supercritical fluid” descrevem nanopartículas sólidas de genisteína vinculadas ou não a veículos. Contudo, os veículos apresentados em tais documentos não são compostos por nanocarreadores lipídicos e tensoativos, diferindo da presente invenção.

**[0017]**As diferentes tecnologias protegidas pelos pedidos CN102652736 (B), 16/04/2012, “Method for preparing soybean isoflavone sustained-release microspheres”, CN101947251 (A), 21/09/2010, “Method for preparing chickpea isoflavone microcapsules”, CN103211769 (A), 04/01/2013, “Method of preparing a controlled release particle of soy isoflavone with biodegradable polymer using a supercritical fluid extraction of emulsion (SFEE) process” e CN103099798 (A), 29/01/2013, “Preparation method of soybean isoflavone-chitosan slow-release microcapsules”, descrevem a incorporação de isoflavonas a sistemas micro ou nanométricos que contêm em suas formulações polímeros ou ciclodextrinas. A presente invenção difere de tais documentos pelo fato de não utilizar tais excipientes em seus processos.

**[0018]**A tecnologia protegida pelo número CN102258475 (B), 28/05/2010, “Daidzein solid lipid nanoparticles and preparation method thereof” descreve a incorporação de daidzeína a NLS pelo método de dispersão de película fina e pelo método de dispersão a quente. A presente invenção emprega um método distinto de preparo das NLS e incorpora uma fração enriquecida em isoflavonas da soja.

**[0019]**A obtenção de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas após hidrólise e purificação do extrato de soja com posterior incorporação a carreadores nanoestruturados foi descrita em alguns artigos científicos. A produção de nanoemulsões contendo fração de isoflavonas da soja foi descrita

por Yatsu et al. (2014) e Nemitz et al. (2015), onde os sistemas foram produzidos pelo método de emulsificação espontânea, porém os trabalhos não apresentam as características quanto ao tamanho das estruturas e o potencial zeta (YATSU, F.K.J., et al.; "A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices". *Food Analytical Methods*, 2014, v. 7, p. 1881–1890; NEMITZ, M.C., et al.; "A versatile, stability-indicating and high-throughput ultra-fast liquid chromatography method for the determination of isoflavone aglycones in soybeans, topical formulations, and permeation assays". *Talanta*, 2015, v. 134, p. 183–193). Destaca-se que a presente invenção utiliza um processo de obtenção das nanoemulsões distinto de tais documentos.

**[0020]** Nanoestruturas lipídicas sólidas contendo fração de isoflavonas da soja foram produzidas por Deshmukh & Amin (2013), onde os sistemas foram produzidos pelo método de fusão, inversão de fases e precipitação na água gelada (DESHMUKH, K.; AMIN, P. "Formulation and evaluation of solid–lipid nanoparticle based 0.1% Soy isoflavone dermal gels". *Journal of Pharmaceutical and BioSciences*, 2013, v. 1, p. 7–18). Destaca-se que a presente invenção utiliza um processo de obtenção das nanopartículas distinto de tal documento.

**[0021]** Nanocápsulas contendo extrato de soja foram produzidas pelo método de mistura de excipientes e posterior secagem por spray-drying (SANSONE, F., et al.; "Enhanced technological and permeation properties of a microencapsulated soy isoflavones extract". *Journal of Food Engineering*, 2013 v. 115, p. 298–305). A presente invenção difere de tal documento pelo fato de não utilizar polímeros na formulação.

**[0022]** A tecnologia protegida sob o número US2002160064 (A1), 31/10/2012, "Cosmetics containing isoflavone aglycones", propõe um produto cosmético contendo isoflavonas incorporadas a lipossomas. Tal tecnologia descreve o preparo dos sistemas pelo método de homogeneização a alta pressão com incorporação de genisteína e/ou daidzeína. Ao final do processo também é



descrita a incorporação de um extrato de alga de *Spirulina platensis*. Alternativamente a tecnologia descreve a utilização de uma fração enriquecida em isoflavonas agliconas obtidos por procedimentos de hidrólise da soja. Contudo, é importante destacar que tal tecnologia não apresenta a etapa de evaporação do solvente orgânico durante a produção dos lipossomas, resultando em um produto final contendo etanol, o que pode causar irritação da pele dos usuários durante o uso. Diferindo da tecnologia US2002160064 (A1), a presente invenção compreende a produção de quatro diferentes tipos de carreadores lipídicos nanométricos aquosos, incluindo lipossomas, contendo a fração de isoflavonas agliconas da soja e livres de solventes orgânicos nos produtos finais.

**[0023]** O documento protegido sob o número KR100482355 (B1), 07/11/2003, “Liposome or nanoemulsion containing dipalmitoylhydroxy and soy isoflavones and production of cosmetic composition containing the same”, descreve uma tecnologia para incorporar isoflavonas e dipalmitoilhidroxiprolina em lipossomas e nanoemulsões para uso em cosméticos. A tecnologia compreende uma formulação composta por 0,01 a 10% de dipalmitoilhidroxiprolina e isoflavonas da soja, 1 a 5% lecitina, 1 a 5% de tensoativo e 20 a 50% de óleo TCM, glicerina e álcool, resultando em nanoemulsões ou lipossomas contendo alto teor de solvente orgânico. Tal tecnologia descreve um produto contendo simultaneamente isoflavonas e aminoácidos, diferindo da presente invenção que utiliza fração de isoflavonas agliconas da soja. Além disso, a presente invenção difere do documento anterior por compreender formulações aquosas com ausência de solvente orgânico no final do processo, além de utilizar o homogeneizador à alta pressão para a produção de quatro diferentes tipos de carreadores lipídicos manométricos aquosos.

**[0024]** O pedido de patente de número PI0805156-9 (A2), 20/11/2008, “Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas” descreve a obtenção de nanopartículas lipídicas

tais como nanoemulsões, nanopartículas, nanoagregados e lipossomas contendo extratos vegetais, preferencialmente de *Achyrocline satureioides*. O processo se dá por dissolução dos componentes oleosos em uma fase orgânica, adição desta fase a uma fase aquosa contendo tensoativos, sob agitação, com posterior evaporação do solvente orgânico. Contudo, não está descrito nas reivindicações do documento a etapa de homogeneização a alta pressão durante o processo de fabricação das nanoestruturas e nem o uso de uma fração enriquecida a partir de um extrato vegetal. Portanto, a presente invenção não apresenta conflitos de interesse com tal documento.

**[0025]** Portanto, como pode ser observado, o estado da arte envolvendo nanotecnologia e isoflavonas não conflite com a tecnologia descrita na presente invenção.

### **Sumário da invenção**

**[0026]** É um objeto da presente invenção carreadores lipídicos de diâmetro médio de gotícula/partícula inferior a 1,0 micrômetro compreendendo fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja.

**[0027]** Em uma realização preferencial, as isoflavonas agliconas da soja são enriquecidas em genisteína, gliciteína e daidzeína.

**[0028]** É um objeto adicional da presente invenção os processos de obtenção das nanoemulsões e lipossomas, caracterizados por:

- a) Dissolver em uma solução orgânica composta por etanol, acetona e/ou mistura etanol:acetona (1:1):
  - i) de 2,0% p/p a 10,0% p/p de fase lipídica;
  - ii) 1,0% p/p de fração de isoflavonas agliconas da soja, em relação à fase lipídica;
- b) Dissolver em uma solução aquosa:
  - iii) 1,0% p/p a 5,0% p/p de tensoativo;
- c) Adicionar a solução orgânica na solução aquosa, sob agitação;
- d) Evaporar o solvente orgânico;

e) Homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão, com 10 ciclos de 500 a 750 bar cada.

**[0029]**É um objeto adicional da presente invenção os processos de obtenção das nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados, caracterizados por:

- a) Dissolver a uma temperatura entre 30° C a 80° C:
  - i) de 2,0% p/p a 10,0% p/p de fase lipídica;
  - ii) 1,0% p/p de fração de isoflavonas agliconas da soja, em relação à fase lipídica;
- b) Dissolver em uma solução aquosa, com temperatura de 30° C a 80° C:
  - iii) de 1,0% p/p a 5,0% p/p de tensoativo;
- c) Adicionar a solução aquosa na solução oleosa, sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;
- d) Agitar no ultra-turrax, sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante período compreendido de 30 segundos a 5 minutos;
- e) Homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão, com 10 ciclos de 500 a 750 bar cada.

**[0030]**É um objeto adicional da presente invenção o uso farmacológico, terapêutico e tecnológico de formulações compreendendo as nanoestruturas lipídicas compreendendo fração de isoflavonas agliconas da soja, nas áreas das ciências da saúde, ciências farmacêuticas, da química e da físico-química, como medicamento e/ou suplemento alimentar.

**[0031]**Em uma realização preferencial, a fração foi obtida por extração em meio hidro-etanólico, com posterior hidrólise ácida e etapas de purificação (NEMITZ, M.C., et al.; “A new approach for the purification of soybean acid extract: simultaneous production of an isoflavone aglycone-rich fraction and a furfural derivative-rich by-product”. *Industrial Crops and Products*, 2015, v. 67, p. 414–421).

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0032]** Os exemplos descritos são meras concretizações preferenciais da presente invenção, não podendo ser compreendidos como limitantes da invenção. Variações ou concretizações similares devem ser consideradas dentro do escopo da presente invenção.

Fração de isoflavonas agliconas da soja:

**[0033]** A fração de isoflavonas agliconas da soja para uso na presente invenção pode ser obtida a partir de qualquer via de obtenção, ou seja, sintética, biossintética ou natural. A fração deve apresentar majoritariamente as isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína.

**[0034]** Em uma realização especial a presente invenção compreende uma fração de isoflavonas agliconas da soja obtida da seguinte forma:

**[0035]** As sementes de soja são primeiramente moídas. O pó é desengordurado através da extração em aparelho de Soxhlet com *n*-hexano durante 9 horas. O pó desengordurado é submetido à extração em aparelho de Soxhlet utilizando etanol 80% em água (v/v) durante 4 horas na proporção droga-solvente 1:10 (p/v). O extrato hidroetanólico é submetido a processo de hidrólise com ácido clorídrico (1,3 M), durante 2 horas a 80 °C. O solvente orgânico é então rotaevaporado, e a parte aquosa restante é particionada com acetato de etila por 4 vezes. A fração orgânica obtida após particionamento é submetida à coluna cromatográfica de sílica gel e a eluição é realizada com solventes de polaridade crescente. A fração obtida após eluição com clorofórmio:acetato de etila 75:25 (v/v) é coletada, rotaevaporada e as isoflavonas agliconas são precipitadas com clorofórmio. O pó obtido é recolhido por filtração e posterior secagem. A fração final é caracterizada por compreender um teor total de 92% de isoflavonas agliconas, expressas como somatório de genisteína, daidzeína e gliciteína.

**[0036]** Em especial a fração de isoflavonas agliconas da soja está presente na formulação compreendendo uma faixa de concentração de 0,2 a 1,0 mg/mL.

Fase lipídica:

**[0037]**A fase lipídica adequada para a presente invenção é constituída por tensoativos lipofílicos, óleos, lipídeos sólidos e/ou mistura desses.

**[0038]**Os tensoativos lipídicos incluem, mas não se limitam a, lecitina e fosfolipídeos. Lecitinas são conhecidas como glicerofosfolipídeos os quais são formados a partir de ácidos graxos, glicerol, ácido fosfórico e colina por esterificação. As lecitinas são frequentemente referenciadas como fosfatidil colinas. Fosfolipídeos adequados para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam, a fosfolipídeos encontrados na gema de ovo e na soja.

**[0039]**Substâncias oleosas adequadas para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a, oleato de decila, isoheptadecano, ésteres do ácido esteárico e/ou oléico, etanolamida de ácido graxo de coco, óleos naturais, como o óleo de milho, amendoim, sésamo, oliva, jojoba, soja, álcool graxo, parafina, triglicerídeos de cadeia média, palmitatos, miristatos e octildodecanol.

**[0040]**Lipídeos sólidos adequados para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a, triglicerídeos (triestearina, tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina), ácidos graxos (ácido esteárico), álcoois graxos (álcool cetílico, álcool estearílico), ceras (mateiga de cacau, cera de carnaúba, cera de abelhas, palmitato de cetila), glicídeos parciais (monoestearato de glicerila, behenato de glicerila, palmitoestearato de glicerila, tripalmitato de glicerila, trimiristato de glicerila, triestearato de glicerila) e/ou mistura destes.

**[0041]**Em uma realização preferencial os lipossomas descritos na presente invenção compreendem o uso de fosfatidilcolina de ovo (2,0% p/p a 10,0% p/p).

**[0042]**Em uma realização preferencial as nanoemulsões descritas na presente invenção compreendem o uso de uma mistura na proporção de 1:4 de lecitina de ovo e triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 10,0% p/p).

**[0043]**Em uma realização preferencial as nanopartículas lipídicas sólidas descritas na presente invenção compreendem o uso de monoestearato de glicerila (2,0% p/p a 10,0% p/p).

**[0044]** Em uma realização preferencial os carreadores lipídicos nanoestruturados descritos na presente invenção compreendem o uso de uma mistura na proporção 7:3 de monoestearato de glicerila e triglicerídeos de cadeia média (2,0% p/p a 10,0% p/p).

Tensoativos hidrofílicos:

**[0045]** Os tensoativos hidrofílicos adequados para o uso na presente invenção incluem os surfactantes aniônicos, não aniônicos, catiônicos e anfóteros.

**[0046]** Preferencialmente, os surfactantes da presente invenção podem ser escolhidos de grupo que compreende, sem, contudo limitar, surfactantes não iônicos como polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 80, monoestearato de sorbitano 20, monoestearato de sorbitano 40, monoestearato de sorbitano 60, monoestearato de sorbitano 80, emulsificantes colato de sódio, deoxicolato de sódio, glicolato de sódio, poloxâmeros, taurocolato de sódio, taureodexicolato de sódio, e/ou mistura destes.

**[0047]** Em uma realização preferencial as formulações descritas na presente invenção compreendem o uso de polissorbato 80 (1,0% p/p a 5,0% p/p).

Solventes orgânicos:

**[0048]** Solventes orgânicos adequados para o uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a, solventes orgânicos polares próticos e apróticos, como por exemplo etanol, acetona e/ou mistura desses.

**[0049]** Em uma realização preferencial os lipossomas e as nanoemulsões da presente invenção compreendem o uso de etanol para a solubilização dos componentes da fase lipídica.

Obtenção das nanoestruturas lipídicas:

**[0050]** Os processos de obtenção das nanoemulsões e lipossomas compreendem as etapas de:

- a) Dissolver, em uma solução orgânica composta por um solvente orgânico polar prótico, um solvente orgânico polar aprótico e/ou mistura solvente orgânico polar prótico:solvente orgânico polar aprótico (1:1):

- i) de 2,0% p/p a 10,0% p/p de fase lipídica;
  - ii) 1,0% p/p de fração de isoflavonas agliconas da soja, em relação à fase lipídica;
- b) Dissolver em uma solução aquosa:
- iii) 1,0% p/p a 5,0% p/p de tensoativo;
- c) Adicionar a solução orgânica na solução aquosa, sob agitação;
- d) Evaporar o solvente orgânico;
- e) Homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão, com 10 ciclos de 500 a 750 bar cada.

**[0051]** O processo de obtenção das nanoestruturas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados compreende as etapas de:

- a) Dissolver a uma temperatura entre 30° C a 80° C:
- i) de 2,0% p/p a 10,0% p/p de fase lipídica;
  - ii) 1,0% p/p de fração de isoflavonas agliconas da soja, em relação à fase lipídica;
- b) Dissolver em uma solução aquosa, com temperatura de 30° C a 80° C:
- iii) de 1,0% p/p a 5,0% p/p de tensoativo;
- c) Adicionar a solução aquosa na solução oleosa, sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;
- d) Agitar no ultra-turrax, sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante período compreendido de 30 segundos a 5 minutos;
- e) Homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão, com 10 ciclos de 500 a 750 bar cada.

#### Formulações compreendendo os carreadores lipídicos

**[0052]** As formulações da presente invenção são formulações que compreendem as nanoestruturas lipídicas, associadas a excipientes adequados, úteis nas áreas alimentar, farmacêutica e cosmética.

**[0053]** Os carreadores da presente invenção podem estar sob a forma de nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados.

Caracterização das nanopartículas lipídicas:

**[0054]** A formação de nanopartículas foi primeiramente confirmada pela evidência de caráter homogêneo (sem separação de fases) e pela não ocorrência de precipitados. A seguir, as formulações foram caracterizadas de acordo com o diâmetro médio de gotícula/partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, e teor.

**[0055]** Determinação do diâmetro de gotícula/partícula e do índice de polidispersão (IPD):

**[0056]** As formulações foram caracterizadas através do espalhamento de luz dinâmico pela difusão de raio laser monocromático que atravessa a dispersão coloidal. Essa determinação foi realizada observando-se o espalhamento a 173° C após diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de 0,22 µm. Os resultados foram expressos como média de três determinações independentes.

Determinação do potencial zeta:

**[0057]** O potencial zeta foi determinado através da mobilidade eletroforética das gotículas. As medidas foram realizadas após calibração com uma solução padrão a - 55 mV (látex poliestireno carboxilato). Todas as análises foram realizadas após a diluição das amostras em água purificada, previamente filtrada em membrana de 0,22 µm. Os resultados foram expressos como média de três determinações independentes.

Teor e taxa de associação:

**[0058]** O teor de isoflavonas agliconas (expressos como somatório de genisteína, gliciteína e daidzeína) foi efetuado por cromatografia líquida de alta eficiência. O método utilizado realiza a separação das isoflavonas em coluna cromatográfica Phenomenex RP-18 (Synergi fusion 150 x 4,6 mm diâmetro interno; tamanho de partícula 4 µm), conectada a uma pré-coluna C18. A fase



móvel é constituída por uma Fase A (acetonitrila acidificada com ácido trifluoroacético 0,01%) e uma Fase B (água acidificada com ácido trifluoroacético 0,1). A eluição é realizada em um sistema gradiente de: 20 – 25% B (0 – 10 min), 25 – 30% B (10 – 15 min), 30 – 35% B (15 – 23 min), 35 – 100% B (23 – 26 min), 20% B (26 – 30 min). O fluxo é mantido a 1,0 mL/min, com volume de injeção de 10 µL, detecção a 260 nm e a temperatura da coluna é mantida a 40° C. O método foi validado conforme guias internacionais e apresentou-se linear na faixa de 0,1 a 10 µg/mL, além de preciso e exato. Todos os componentes das formulações foram avaliados para análise de especificidade, e o método mostrou-se específico para quantificação das isoflavonas agliconas em todas as condições avaliadas.

**[0059]**A taxa de associação foi realizada através da ultrafiltração/centrifugação das formulações e posterior avaliação de teor de isoflavonas presente na fase aquosa inferior do ultrafiltrado. Para tanto uma amostra foi submetida ao processo de filtração em membranas de ultrafiltração de 10 kDa durante 30 minutos de centrifugação a uma força de 5000 g.

**Exemplo 1:** Nanocarreador lipídico consistindo de uma nanoemulsão.

Composição final:

**[0060]**Fase lipídica

- a. 8,0% p/p Triglicerídeos de cadeia média
- b. 2,0% Lecitina de ovo
- c. 1,0 mg/mL Fração de isoflavonas agliconas da soja

**[0061]**Fase aquosa

- a. 1,0% de Polissorbato 80

Procedimento:

**[0062]**Primeiramente, os componentes da fase lipídica são pesados e dissolvidos em etanol absoluto, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa são pesados e dissolvidos em água purificada, com agitação constante. A proporção fase aquosa: fase orgânica deve ser 2:1. A fase

orgânica é vertida lentamente com auxílio de uma seringa sobre a fase aquosa, mantendo-se uma agitação constante durante 15 minutos. A formulação é rota evaporada, para eliminação do solvente orgânico e até a redução ao volume final desejado. Ao final do processo, a formulação é então homogeneizada em homogeneizador a alta pressão com 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter os diâmetros de partícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão.

**[0063]**Produto obtido: Nanoemulsão.

Resultados:

**[0064]**Tamanho: 166 nm

**[0065]**IPD: 0,10

**[0066]**Zeta: -30,1 mV

**[0067]**Teor: 0,92 mg/mL de isoflavonas agliconas totais, apresentando uma taxa de associação de 100%.

**Exemplo 2:** Nanocarreador lipídico consistindo de um lipossoma.

Composição:

**[0068]**Fase orgânica

- a. 2% p/p Fosfatidilcolina de ovo
- b. 0,2 mg/mL Fração de isoflavonas agliconas da soja

**[0069]**Fase aquosa

- a. 1,0% p/p Polissorbato 80

Procedimento:

**[0070]**Primeiramente, os componentes da fase lipídica são pesados e dissolvidos em etanol absoluto, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa são pesados e dissolvidos em água purificada, com agitação constante. A proporção fase aquosa: fase orgânica deve ser 2:1. A fase orgânica é vertida lentamente com auxílio de uma seringa sobre a fase aquosa, mantendo-se uma agitação constante durante 15 minutos. A formulação é rota evaporada, para eliminação do solvente orgânico e até a redução ao volume

final desejado. Ao final do processo, a formulação é então homogeneizada em homogeneizador a alta pressão com 10 ciclos de 500 bar cada, a fim de manter os diâmetros de partícula da fase oleosa o menor possível e com menor índice de polidispersão.

[0071]Produto obtido: Lipossoma.

Resultados:

[0072]Tamanho: 94 nm

[0073]IPD: 0,017

[0074]Zeta: -4,05 mV

[0075]Teor: 0,156 mg/mL de isoflavonas agliconas totais.

**Exemplo 3:** Nanocarreador lipídico consistindo de uma nanopartícula lipídica sólida.

Composição:

[0076]Fase orgânica

- a. 2% p/p Monoestearato de glicerila
- b. 0,2 mg/mL Fração de isoflavonas agliconas da soja

[0077]Fase aquosa

- a. 1,0% p/p Polissorbato 80

Procedimento:

[0078]Primeiramente, os componentes da fase lipídica são pesados e dissolvidos a uma temperatura de 80° C, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa são pesados e dissolvidos para um volume final de 100 mL de água purificada, com agitação constante a uma temperatura de 80° C. A fase aquosa é vertida sobre a fase lipídica, mantendo-se a temperatura a 80° C e com agitação constante durante 15 minutos. A formulação é misturada em ultra-turrax durante 1 minuto, a uma velocidade de 13.500 rpm e temperatura de 80° C. Ao final do processo, a formulação é então homogeneizada a quente em homogeneizador a alta pressão com 10 ciclos de 750 bar cada, a fim de manter os diâmetros de partícula da fase oleosa o

menor possível e com menor índice de polidispersão. O produto é deixado em repouso a uma temperatura ambiente por no mínimo 10 minutos.

**[0079]**Produto obtido: Nanopartícula lipídica sólida.

Resultados:

**[0080]**Tamanho: 396 nm

**[0081]**IPD: 0,60

**[0082]**Zeta: -22,20 mV

**[0083]**Teor: 0,166 mg/mL de isoflavonas agliconas totais.

**Exemplo 4:** Nanocarreador lipídico consistindo de um carreador lipídico nanoestruturado.

Composição:

**[0084]**Fase orgânica

- a. 1,4% p/p Monoestearato de glicerila
- b. 0,6% p/p Triglicerídeos de cadeia média
- c. 0,2 mg/mL Fração de isoflavonas agliconas da soja

**[0085]**Fase aquosa

- a. 1,0% p/p Polissorbato 80

Procedimento:

**[0086]**Primeiramente, os componentes da fase lipídica são pesados e dissolvidos a uma temperatura de 80° C, com agitação constante. Os componentes da fase aquosa são pesados e dissolvidos para um volume final de 100 mL de água purificada, com agitação constante a uma temperatura de 80° C. A fase aquosa é vertida sobre a fase lipídica, mantendo-se a temperatura a 80° C e com agitação constante durante 15 minutos. A formulação é misturada em ultra-turrax durante 1 minuto, a uma velocidade de 13.500 rpm e temperatura de 80° C. Ao final do processo, a formulação é então homogeneizada a quente em homogeneizador a alta pressão com 10 ciclos de 750 bar cada, a fim de manter os diâmetros de partícula da fase oleosa o

menor possível e com menor índice de polidispersão. O produto é deixado em repouso a uma temperatura ambiente por no mínimo 10 minutos.

**[0087]** Produto obtido: Carreador lipídico nanoestruturado.

Resultados:

**[0088]** Tamanho: 220 nm

**[0089]** IPD: 0,451

**[0090]** Zeta: -13,36 mV

**[0091]** Teor: 0,156 mg/mL de isoflavonas agliconas totais.

### **Reivindicações**

1. Carreadores lipídicos de tamanho nanométrico **caracterizados por** compreenderem uma fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja incorporadas em carreadores lipídicos de tamanho nanométrico.
2. Carreadores lipídicos de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados pelo** diâmetro de gotícula/partícula médio estar compreendido na faixa que vai de 0,01 a 1,0 micrômetro.
3. Carreadores lipídicos, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados pela** fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja compreender majoritariamente daidzeína, genistéina e gliciteína.
4. Carreadores lipídicos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizados pela** fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja ser obtida a partir de extrato de soja com posterior etapas de hidrólise e purificação.
5. Carreadores lipídicos, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizados pela** fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja ser obtida comercialmente.
6. Processo de produção de carreadores lipídicos **caracterizado por** compreender etapas de:
  - a) Dissolver, em um solvente orgânico:
    - i) de 2,0% p/p a 10,0% p/p de fase lipídica;
    - ii) 1,0% p/p de fração de isoflavonas agliconas da soja, em relação à fase lipídica;
  - b) Dissolver, em uma solução aquosa,:
    - iii) 1,0% p/p a 5,0% p/p de tensoativo;
  - c) Adicionar a solução orgânica da etapa a) na solução aquosa da etapa b), sob agitação;
  - d) Evaporar o solvente orgânico; e
  - e) Homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão, com 10 ciclos de 500 a 750 bar cada.

7. Processo de produção de carreadores lipídicos **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a) Dissolver a uma temperatura entre 30° C a 80° C,;
  - i) de 2,0% p/p a 10,0% p/p de fase lipídica;
  - ii) 1,0% p/p de fração de isoflavonas agliconas da soja, em relação à fase lipídica;
- b) Dissolver, em uma solução aquosa, com temperatura de 30° C a 80° C:
  - iii) de 1,0% p/p a 5% p/p de tensoativo;
- c) Adicionar a solução aquosa da etapa a) na solução oleosa da etapa b), sob agitação e com temperatura de 30° C a 80° C;
- d) Agitar no ultra-turrax, sob aquecimento de 30° C a 80° C, durante período compreendido de 30 segundos a 5 minutos; e
- e) Homogeneizar a formulação em homogeneizador à alta pressão, com 10 ciclos de 500 a 750 bar cada.

8. Processo de produção, de acordo com as reivindicações 6 ou 7, **caracterizado pela** fração de isoflavonas agliconas da soja compreender daidzeína, genistéina e gliciteína.

9. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pela** fração de isoflavonas agliconas da soja compreender uma faixa de concentração de 0,2 a 1,0 mg/mL.

10. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pela** fração de isoflavonas agliconas da soja ser obtida a partir de extrato de soja com posterior etapas de hidrólise e purificação.

11. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pela** fração de isoflavonas agliconas da soja ser obtida comercialmente.

12. Processo de produção, de acordo com as reivindicações 6 ou 7, **caracterizado pelo** solvente orgânico ser escolhido do grupo que compreende solventes orgânicos polares próticos, solventes orgânicos polares apróticos e mistura dos mesmos.

13. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** solvente orgânico polar prótico ser etanol, e o solvente orgânico polar aprótico ser acetona.

14. Processo de produção, de acordo com as reivindicações 6 ou 7, **caracterizado pela** fase lipídica compreender de 2,0% p/p a 10,0% p/p de lipídeos sólidos, líquidos e/ou mistura dos mesmos

15. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pela** fase lipídica ser escolhida do grupo que compreende:

a) lipídeos sólidos tais como triestearina, tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, ácido esteárico, álcool cetílico, álcool estearílico, mateiga de cacau, cera de carnaúba, cera de abelhas, palmitato de cetila, monoestearato de glicerila, behenato de glicerila, palmitoestearato de glicerila, tripalmitato de glicerila, trimiristato de glicerila, triestearato de glicerila e/ou mistura destes;

b) lipídeos líquidos tais como oleato de decila, isohexadecano, ésteres do ácido esteárico e/ou oléico, etanolamida de ácido graxo de coco, óleos naturais, como o óleo de milho, amendoim, sésamo, oliva, jojoba, soja, álcool graxo, parafina, triglicerídeos de cadeia média, palmitatos, miristatos e octildodecanol; e

c) tensoativos lipofílicos tais como lecitinas e fosfolipídeos e/ou mistura dos mesmos.

16. Processo de produção, de acordo com as reivindicações 6 ou 7, **caracterizado pela** fase aquosa compreender de 1,0% p/p a 5,0% p/p de tensoativo hidrofílico.

17. Processo de produção, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo** tensoativo hidrofílico ser escolhido do grupo que compreende polissorbatos, monoestearatos de sorbitano, colato de sódio, deoxicolato de sódio, glicolato de sódio, poloxâmeros, taurocolato de sódio, taureodexicolato de sódio, e/ou mistura destes.

18. Formulação compreendendo carreadores lipídicos caracterizada pelo carreador lipídico ser conforme definido nas reivindicações 1 a 5.



## **Resumo**

CARREADORES LIPÍDICOS DE TAMANHO NANOMÉTRICO COMPREENDENDO FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE ISOFLAVONAS AGLICONAS DA SOJA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS MESMOS E FORMULAÇÕES COMPREENDENDO OS MESMOS

A presente invenção descreve carreadores lipídicos de diâmetro médio de gotícula/partícula inferior a 1,0 micrômetro compreendendo uma fração enriquecida de isoflavonas agliconas da soja para uso alimentar, farmacêutico e/ou cosmético. A presente invenção também descreve os processos de obtenção das nanoestruturas por processo de mistura de uma fase orgânica e uma fase oleosa sob agitação, com posterior evaporação do solvente orgânico, e etapa final de homogeneização à alta pressão. As formulações compreendem tais nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas ou carreadores lipídicos nanoestruturados.