REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102022024779-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102022024779-0

(22) Data do Depósito: 02/12/2022

(43) Data da Publicação Nacional: 18/06/2024

(51) Classificação Internacional: A61K 31/04; A61K 9/14; A61P 17/00.

(52) Classificação CPC: A61K 31/04; A61K 9/141; A61P 17/00.

(54) Título: COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOSTRUTURADO CONTENDO 1- NITRO-2-FENILETANO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO PARA TRATAMENTO DE DERMATOFITOSES

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 04378626000197. Endereço: AVENIDA GENERAL RODRIGO OTÁVIO, 6200, COROADO, Manaus, AM, BRASIL(BR), 69080-900, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 92969856000198. Endereço: AV. PAULO GAMA Nº 110, 6º ANDAR, Centro, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL(BR), 90040-060, Brasileira

(72) Inventor: LETÍCIA SCHERER KOESTER; TAINÁ KREUTZ; ALEXANDRE ROLIM MINETO; BÁRBARA SOUZA DA COSTA; ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA; VALDIR FLORENCIO DA VEIGA JUNIOR.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 02/12/2022, observadas as condições legais

Expedida em: 15/09/2026

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues
Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOSTRUTURADO CONTENDO 1-NITRO-2-FENILETANO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO PARA TRATAMENTO DE DERMATOFITOSES

Campo da Invenção

[0001] A presente patente de invenção refere-se a uma composição farmacêutica nanotecnológica destinada ao tratamento tópico de dermatofitoses. Mais especificamente, a composição farmacêutica compreende um carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo como principal ativo o 1-nitro-2-feniletano, associado ou não ao metileugenol, para o tratamento de infecções de pele ou de anexos cutâneos provocadas por fungos dermatófitos.

Antecedentes da Invenção

[0002] Dermatofitoses são infecções de pele ou de anexos cutâneos provocadas por fungos dermatófitos, os quais consomem a queratina presente nesses locais para manutenção de suas funções metabólicas. As dermatofitoses, também chamadas de *tinea*, podem ocorrer em diversos locais da pele, o que origina as suas classificações clínicas, como no corpo (sendo denominadas de *tinea corporis*), nos pés (*tinea pedis*), nas mãos (*tinea manus*), na área da barba (*tinea barbae*), na pele glabra da face (*tinea faciei*) e no couro cabeludo (*tinea capitis*). Em geral, as dermatofitoses de pele são causadas por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e geram reações inflamatórias, manchas, erupções, escamação e coceira no local afetado, impactando negativamente na qualidade de vida do indivíduo acometido pela doença. As dermatofitoses podem também atingir as unhas, sendo designadas de *tinea unguium* ou de onicomicoses (DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). Mycopathologia, v. 166, n. 5, p. 257-265, 2008).

[0003] Onicomicoses são infecções fúngicas que acometem as unhas das mãos ou dos pés causadas essencialmente por fungos dermatófitos, mas também por fungos não-dermatófitos ou leveduras. Essa doença é considerada a principal que afeta as unhas, ocorrendo frequentemente em indivíduos mais velhos. Possui uma prevalência mundial de 5,5%, a qual tende a aumentar devido ao envelhecimento da população. Os fatores de risco para as onicomicoses, além da idade avançada, incluem: traumas persistentes na lâmina ungueal, uso de sapatos oclusivos, ambientes úmidos, *Tinea pedis* (pé-de-atleta), psoríase, hiperhidrose, diabetes, condições de imunossupressão, tabagismo e predisposição genética (GUPTA, A. K. et al. Onychomycosis: a review. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 34, n. 9, p. 1972-1990, 2020).

[0004] Aproximadamente 90% das onicomicoses de pés e 75% das onicomicoses de mãos são causadas por fungos dermatófitos, destacando-se os agentes *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, responsáveis pela grande maioria dos casos de onicomicoses dermatofíticas. Fungos não-dermatófitos são responsáveis por cerca de apenas 10 a 20% dos casos de onicomicoses, dentre os quais pode-se mencionar agentes das espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*. Onicomicoses causadas por leveduras são menos comuns, no entanto, quando ocorrem, geralmente são decorrentes de infecções por *Candida albicans* (LEUNG, A. K. C. et al. Onychomycosis: an updated review. Recent patents on inflammation & allergy drug discovery, v. 14, n. 1, p. 32-45, 2020).

[0005] O aparato ungueal não possui uma imunidade celular efetiva e as onicomicoses são adquiridas pelo contato direto do agente fúngico com as unhas, considerando os fatores de risco previamente mencionados. Os fungos causadores dessa doença produzem enzimas queratolíticas, proteolíticas e lipolíticas, as quais auxiliam na degradação da queratina e dos demais constituintes da lâmina ungueal, favorecendo a instalação do agente fúngico nas unhas. Nesse sentido, clinicamente, as onicomicoses causam: a descoloração

da lâmina ungueal, que adquire aspecto amarelado, esbranquiçado ou amarronzado; o descolamento da lâmina ungueal do leito ungueal, (onicólise); o espessamento da lâmina ungueal (onicauxe); a hiperqueratose subungueal; a fragilidade da unha; a dor no local afetado; e os dermatofitomas, que são abcessos fúngicos que se apresentam na forma de estrias longitudinais esbranquiçadas ou de colorações características (LIPNER, R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 80, n. 4, p. 835-851, 2019).

[0006] Tendo em vista suas manifestações clínicas, as onicomicoses impactam negativamente na qualidade de vida do indivíduo acometido por essa doença, podendo causar constrangimentos pelo aspecto alterado da unha, desconfortos pela dor no local, dificuldades na execução de atividades diárias, como tarefas manuais e calçar sapatos, e dificuldades ao caminhar (LIPNER, R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 80, n. 4, p. 835-851, 2019).

[0007] O tratamento das onicomicoses possui o objetivo de eliminar o agente fúngico e de restaurar o aspecto normal das unhas, podendo ser realizado pelo uso de medicamentos orais (sistêmicos) ou tópicos, por terapia a laser, por terapia fotodinâmica ou, ainda, pela avulsão cirúrgica da lâmina ungueal em casos mais graves. A terapia medicamentosa, tópica e/ou oral, consiste no método de tratamento mais empregado. Contudo, onicomicoses são difíceis de tratar com o uso dos medicamentos convencionais devido a instalação do fungo nas camadas mais profundas da lâmina ungueal, ao longo tempo de tratamento requerido, aos casos frequentes de recidiva, a possibilidade de ocorrência de resistência fúngica e a baixa adesão pelo paciente (LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 80, n. 4, p. 853-867, 2019).

[0008] Os medicamentos destinados à administração oral mais empregados, aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), incluem a terbinafina, o itraconazol e o fluconazol. Tais medicamentos

apresentam um amplo espectro de ação contra dermatófitos, entretanto, requerem um longo tempo de tratamento, o qual pode variar de 6 a 12 semanas, em média.

[0009] Ademais, apesar de possuírem alta eficácia quando comparados aos outros tipos de tratamentos, os medicamentos antifúngicos orais causam efeitos adversos, como cefaleia, desconfortos gastrointestinais, dores abdominais, *rash* cutâneo, elevação de enzimas transaminases e distúrbios de paladar. Adicionalmente, podem causar hepatotoxicidade e disfunção renal, a depender do tempo de utilização. Outra desvantagem da terapia sistêmica é a possibilidade de ocorrência de interações medicamentosas, o que pode levar à alteração do perfil farmacocinético e, consequentemente, à eficácia reduzida ou toxicidade do próprio medicamento antifúngico ou do medicamento administrado concomitantemente (LIPNER, S. R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 80, n. 4, p. 853-867, 2019).

[0010] Os medicamentos tópicos comumente recomendados para o tratamento de onicomicoses, aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), incluem o ciclopirox a 8% e a amorolfina a 5%, os quais devem ser administrados sobre as unhas por um período prolongado, que varia de 6 a 12 meses.

[0011] O tratamento tópico apresenta como vantagens a não ocorrência de efeitos adversos sistêmicos e de interações medicamentosas. Adicionalmente, de forma geral, não apresenta toxicidade e contraindicações. Entretanto, os medicamentos tópicos convencionais disponíveis apresentam menor efetividade em relação aos medicamentos orais e requerem um maior tempo de tratamento, o que é atribuído à permeação insuficiente dos fármacos na lâmina ungueal. As unhas funcionam como uma barreira à permeação de compostos exógenos devido a sua composição altamente queratinizada e as redes estáveis de interação entre as moléculas de queratina, as quais ocorrem por ligações de dissulfeto e de hidrogênio (BAROT, B. S. et al. Drug delivery to the nail:

therapeutic options and challenges for onychomycosis. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, v. 31, n. 6, 2014.).

[0012] Após o tratamento da onicomicose utilizando-se os medicamentos disponíveis, recidivas (mesma infecção após a cura incompleta) ou reinfecções (mesma infecção após a cura completa) ocorrem em 20 a 25% dos casos, o que pode estar associado, dentre outros fatores, à resistência fúngica aos fármacos convencionais (GROVER, C.; KHURANA, A. An update on treatment of onychomycosis. Mycoses, v. 55, n. 6, p. 541-551, 2012).

[0013] O estado da técnica descreve diversas composições farmacêuticas, nanoestruturadas ou não, que empregam óleos essenciais visando tratar topicamente infecções fúngicas, tal como o documento BR112019005016 que descreve uma composição sob a forma de um gel hidrofóbico com atividade antifúngica para aplicação tópica, incluindo a associação dos óleos essenciais de melaleuca, orégano e lima em um éster de vitamina E.

[0014] O documento BR102019009921 descreve uma composição de carreadores lipídicos nanoestruturados com intrínseca ação anestésica, bactericida, antifúngica e biopesticida, contendo os óleos essenciais de alho, canela, pimenta preta e hortelã-pimenta, isoladamente ou em combinação.

[0015] O documento BR102018072899 descreve uma composição farmacêutica na forma de uma nanoemulsão, empregando como composto ativo o óleo essencial de *Piper aduncum*, destinada à administração tópica no tratamento de infecções fúngicas ou bacterianas e de feridas oriundas de leishmaniose cutânea.

[0016] O documento BR102018016526 descreve uma composição fitoterápica micro e/ou nanoestruturada, na forma líquida ou seca, contendo como composto ativo o óleo essencial de *Lippia sidoides* para o tratamento da otite externa em animais e combate aos agentes fúngicos *Malassezia* spp., *Candida* spp., *Trichophyton* spp., *Neoscytalidium* spp.

[0017] Adicionalmente, também são descritas composições farmacêuticas nanoestruturadas contendo fármacos antimicrobianos que propõem tratar infecções fúngicas.

[0018] O documento IN201811021213 descreve um carreador lipídico nanoestruturado para liberação controlada do fármaco itraconazol, a ser administrado pela via ocular no tratamento de ceratite fúngica.

[0019] O documento WO202028916 descreve um carreador lipídico nanoestruturado conjugado com polietilenoglicol (PEG) contendo o fármaco anfotericina B, objetivando tratar infecções fúngicas.

[0020] Os documentos do estado da técnica descrevem formulações farmacêuticas de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo óleos essenciais e fármacos antifúngicos comerciais. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são um tipo de sistema lipídico de liberação de compostos ativos no qual a fase dispersa possui tamanho na escala nanométrica, geralmente entre 10 a 500 nm. São formados, essencialmente, por uma mistura de lipídios sólido (LS) e líquido (LL) a temperatura ambiente em uma proporção que varia de 70:30 a 99,9:0,1 (LS:LL), tensoativos e água (SHARMA, A.; BALDI, A. Nanostructured lipid carriers: A review. Journal of Developing Drugs, v. 7, n. 2, p. 1000191, 2018).

[0021] Os CLN contornam as limitações das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nas quais a matriz lipídica é composta apenas por um lipídio sólido à temperatura ambiente, resultando na baixa capacidade de carreamento do composto ativo e na sua expulsão durante o período de armazenamento pela cristalização do lipídio sólido. Além disso, os CLN diferem-se das nanoemulsões, nas quais a matriz lipídica é composta apenas por lipídio(s) líquido(s) à temperatura ambiente, não compreendo um lipídio sólido, o que resulta em um nanosistema com propriedades e aplicações distintas (PATEL, K. et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) a modern approach for topical delivery: a review. World J. Pharm. Pharm. Sci, v. 2, p. 921-938, 2013).

[0022] Os CLN constituem um sistema capaz de proporcionar a solubilização de compostos ativos hidrofóbicos em uma dispersão aquosa, de controlar a liberação e de aumentar a permeabilidade e a biodisponibilidade (sistêmica ou tópica) de compostos ativos, sendo essas propriedades as principais responsáveis pela sua aplicação na área farmacêutica. Os CLN podem ser empregados tanto para o carreamento de compostos ativos hidrofóbicos, os quais, nesse caso, situam-se dentro do núcleo lipídico, quanto para o carreamento de compostos ativos hidrofílicos, os quais encontram-se junto à camada de tensoativos, na interface óleo-água. Adicionalmente, o sistema de CLN apresenta diversas vantagens reconhecidas como: a biocompatibilidade, a possibilidade de não utilizar solventes orgânicos para sua produção, a depender do método empregado, a facilidade de escalonamento e esterilização, o alto percentual de encapsulamento do composto de interesse dentro da nanoestutura e a alta estabilidade físico-química do sistema (SHARMA, A.; BALDI, A. Nanostructured lipid carriers: A review. Journal of Developing Drugs, v. 7, n. 2, p. 1000191, 2018).

[0023] Além disso, os CLN fornecem proteção físico-química para compostos lábeis. Nesse sentindo, constituem uma alternativa para veiculação de compostos de origem natural em formulações farmacêuticas, tais quais os óleos essenciais e seus componentes, pois evitam sua degradação por hidrólise, oxidação e/ou fotólise, reações que podem ser desencadeadas pela ação de fatores ambientais, como umidade, oxigênio e luz. Adicionalmente, o encapsulamento de óleos essenciais ou de seus constituintes em um sistema de CLN impede a volatilização, propriedade intrínseca a esses compostos, o que limita o seu emprego em formulações farmacêuticas convencionais (KATOPODI, A.; DETSI, A. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 630, p. 127529, 2021).

[0024] Diversas técnicas são estabelecidas para produção de CLN, dentre as quais pode-se mencionar: a homogeneização à alta pressão; a homogeneização a alto cisalhamento; a homogeneização a alta velocidade; a ultrassonicação; a microemulsão; a emulsificação-evaporação de solvente; a injeção com evaporação de solvente; a múltipla emulsão; e a inversão de fases. Geralmente, as técnicas que não empregam solventes orgânicos são realizadas à quente, enquanto as técnicas que empregam, são operadas à frio. Ademais, pode haver a combinação de diferentes técnicas e/ou adaptação nas já existes (PATEL, K. et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) a modern approach for topical delivery: a review. World J. Pharm. Pharm. Sci, v. 2, p. 921-938, 2013).

[0025] Dessa forma, é objeto da presente invenção um carreador lipídico nanoestruturado contendo 1-nitro-2-feniletano, associado ou não ao metileugenol, componentes que podem ser encontrados no óleo essencial de *Aniba canelilla*, para o tratamento tópico de infecções fúngicas como as onicomicoses ou as dermatofitoses em geral.

[0026] A *Aniba canelilla* (Kunth) Mez é uma árvore aromática de porte médio pertencente à família Lauraceae. Popularmente, é conhecida como Casca Preciosa, Falsa Canela, Casca do Maranhão ou Folha preciosa. Essa espécie é nativa de países da América do Sul (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), sendo encontrada principalmente na região amazônica (SOUZA-JUNIOR, F. J. C. et al. *Aniba canelilla* (Kunth) Mez (Lauraceae): A review of ethnobotany, phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular, and neurological properties. Frontiers in Pharmacology, v. 11, p. 699, 2020).

[0027] O óleo essencial de *Aniba canelilla* (OEAc) apresenta dois principais constituintes, o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol, sendo extraído a partir do tronco, galhos, folhas e cascas dessa árvore por destilação de arraste a vapor ou por hidrodestilação, fazendo-se o uso de um aparato do tipo Clevenger (SOUZA-JUNIOR, F. J. C. et al. *Aniba canelilla* (Kunth) Mez (Lauraceae): A review of ethnobotany, phytochemical, antioxidant, anti-

inflammatory, cardiovascular, and neurological properties. Frontiers in Pharmacology, v. 11, p. 699, 2020).

[0028] O 1-nitro-2-feniletano é um nitroderivado raramente encontrado em plantas, sintetizado pela biotransformação da fenilalanina por enzimas da CYP. Possui a fórmula molecular $C_8H_9NO_2$ e uma massa molecular de 151,16 g/mol. O metileugenol, denominado quimicamente de 1-alil-3,4-dimetoxibenzeno, é formado pela reação de metilação do eugenol, composto fenólico que também pode estar presente no OEAc. Apresenta a fórmula molecular $C_{11}H_{14}O_2$ e uma massa molecular de 178,23 g/mol (SOUZA-JUNIOR, F. J. C. et al. *Aniba canelilla* (Kunth) Mez (Lauraceae): A review of ethnobotany, phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular, and neurological properties. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 699, 2020).

[0029] A literatura técnica descreve as propriedades terapêuticas para o OEAc, dentre as quais destacam-se as atividades antioxidante, hipotensora, bradicárdica, anticolinesterásica, leishmanicida, tripanocida, antibacteriana e antifúngica contra diferentes espécies de *Candida*. No entanto, o estado da técnica não descreve o uso do OEAc e do 1-nitro-2-feniletano na atividade antifúngica contra dermatófitos (DA TRINDADE, R. C. S. et al. Chemical diversity and therapeutic effects of essential oils of Aniba species from the Amazon: a review. Plants, v. 10, n. 9, p. 1854, 2021).

[0030] Tendo em vista o exposto, as dermatofitoses, especialmente as onicomicoses, carecem de alternativas terapêuticas inovadoras que visem contornar as desvantagens das terapias medicamentosas atualmente disponíveis. Nesse sentido, a presente invenção propõe o emprego do 1-nitro-2-feniletano, associado ou não ao metileugenol, em um sistema de carreador lipídico nanoestruturado. Salienta-se que tanto o 1-nitro-2-feniletano quanto o metileugenol são comumente encontrados como constituintes majoritários do óleo essencial de *Aniba canelilla*, no entanto, também podem ser obtidos a partir de síntese química.

[0031] O carreador lipídico nanoestruturado objeto da invenção apresenta propriedades de permeação ungueal e cutânea otimizadas, considerando o seu reduzido tamanho de partícula, e evita a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos e de interações medicamentosas por ser destinado à aplicação tópica. O referido carreador lipídico nanoestruturado, adicionalmente, evita a volatilização do composto ativo e o protege contra possíveis reações de degradação, o que não seria possível em uma composição farmacêutica tradicional. Ademais, a alternativa de liofilização da composição objeto da invenção, resultando em um carreador lipídico nanoestruturado liofilizado, amplia a sua estabilidade físico-química e microbiológica quando comparada a um produto de base aquosa, o que propicia sua comercialização como um produto intermediário, o qual pode ser redisperso em diversos veículos farmacêuticos líquidos ou semissólidos adequados à aplicação sobre as unhas ou sobre a pele.

Sumário da Invenção

[0032] A invenção descreve uma composição farmacêutica nanotecnológica que compreende um carreador lipídico nanoestruturado contendo como principal ativo o 1-nitro-2-feniletano, isolado ou associado ao metileugenol.

[0033] A invenção descreve uma composição farmacêutica nanotecnológica potencialmente útil para o tratamento tópico de dermatofitoses, mais especificamente de onicomicoses.

[0034] A invenção descreve uma composição farmacêutica nanotecnológica que evita efeitos adversos sistêmicos e interações medicamentosas, em virtude da aplicação tópica, apresentando propriedades de permeação ungueal e cutânea otimizadas, contornando o efeito barreira da lâmina ungueal e da pele e permitindo a chegada do ativo em seu sítio de ação.

[0035] A invenção descreve uma composição farmacêutica nanotecnológica que utiliza um carreador lipídico nanoestruturado que impede a volatilização do composto ativo (1-nitro-2-feniletano isolado ou associado ao

metileugenol) e fornece proteção contra possíveis reações de degradação, tais como hidrólise, oxidação e fotólise, desencadeadas por fatores ambientais (umidade, oxigênio e luz).

[0036] A invenção descreve uma composição farmacêutica nanotecnológica que opcionalmente utiliza um carreador lipídico nanoestruturado liofilizado que provê maior estabilidade físico-química e microbiológica quando comparado a um produto de base aquosa, possuindo potencial para ter um longo prazo de validade.

[0037] A invenção descreve uma composição farmacêutica nanotecnológica que opcionalmente utiliza um carreador lipídico nanoestruturado liofilizado que provê um produto intermediário versátil, podendo ser redisperso em diferentes formas farmacêuticas líquidas ou semissólidas finais.

Breve Descrição das Figuras

[0038] A Figura 1A apresenta o Gráfico de Pareto e a Figura 1B apresenta o Gráfico de Efeitos Principais para a variável dependente tamanho de partícula (Y_1).

[0039] A Figura 2A apresenta o Gráfico de Pareto e a Figura 2B apresenta o Gráfico de Efeitos Principais para a variável dependente índice de polidispersão (Y_2).

[0040] A Figura 3A apresenta o Gráfico de Pareto e a Figura 3B apresenta o Gráfico de Efeitos Principais para a variável dependente potencial zeta (Y_3).

[0041] A Figura 4A apresenta o Gráfico de Pareto e a Figura 4B apresenta o Gráfico de Efeitos Principais para a variável dependente teor de 1-nitro-2-feniletano (Y_6).

[0042] A Figura 5A apresenta o Gráfico de Pareto e a Figura 5B apresenta o Gráfico de Efeitos Principais para a variável dependente teor de metileugenol (Y_7).

[0043] A Figura 6A apresenta o Gráfico de Pareto e a Figura 6B apresenta o Gráfico de Efeitos Principais para a variável dependente carreamento de 1-nitro-2-feniletano (Y_8).

[0044] A Figura 7A apresenta o Gráfico de Pareto e a Figura 7B apresenta o Gráfico de Efeitos Principais para a variável dependente carreamento de metileugenol (Y_9).

[0045] A Figura 8A apresenta a análise da recidiva do ensaio *ex vivo* em unhas suínas infectadas com fungo dermatófito para o óleo essencial de *Aniba canelilla* diluído a 10%, a Figura 8B apresenta o controle positivo e a Figura 8C apresenta o controle negativo.

[0046] A Figura 9A apresenta a análise da recidiva do ensaio *ex vivo* em unhas suínas infectadas com fungo dermatófito para o carreador lipídico nanoestruturado, a Figura 9B apresenta o controle positivo e a Figura 9C apresenta o controle negativo.

Descrição Detalhada da Invenção

[0047] A composição de carreador lipídico nanoestruturado, objeto da presente patente de invenção, contém entre 1,0 e 25,0% p/p do óleo essencial de *Aniba canelilla* constituído de 1-nitro-2-feniletano.

[0048] Opcionalmente, o óleo essencial de *Aniba canelilla*, além de ser constituído de 1-nitro-2-feniletano, também é constituído de metileugenol.

[0049] Opcionalmente, a composição de carreador lipídico nanoestruturado, objeto da presente patente de invenção, contém entre 1,0 e 25,0% p/p de 1-nitro-2-feniletano isolado a partir do óleo essencial de *Aniba canelilla.*

[0050] Opcionalmente, a composição de carreador lipídico nanoestruturado, objeto da presente patente de invenção, contém entre 1,0 e 25,0% p/p de 1-nitro-2-feniletano e entre 1,0 e 25,0% p/p de metileugenol, isolados a partir do óleo essencial de *Aniba canelilla.*

[0051] Opcionalmente, o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol são sintetizados quimicamente.

[0052] O carreador lipídico nanoestruturado compreende entre 1,0 e 25,0% de um lipídio sólido; entre 1,0 e 8,0% de um tensoativo lipofílico não iônico com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre 3 e 6; entre 1,0 e 8,0% de um tensoativo hidrofílico não iônico com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre 8 e 18; e água em q.s.p.

[0053] Opcionalmente, o carreador lipídico nanoestruturado contém entre 1,0 e 25,0% de um outro lipídio líquido, além de seu composto ativo, o qual já cumpre com essa função.

[0054] O lipídio sólido compreende qualquer matéria-prima lipídica com ponto de fusão superior a 30°C, preferentemente selecionado dentre ácido esteárico, palmitato de cetila, triestearina, cera de abelha, manteiga de tucumã, manteiga de ucuúba, manteiga de carnaúba, manteiga de cacau, manteiga de murumuru, manteiga de karité, manteiga de babaçu, manteiga de coco, isoladamente ou em associação.

[0055] O tensoativo lipofílico preferentemente é selecionado dentre os grupos dos ésteres de sorbitano e ésteres de glicol e glicerol, como oleato de sorbitano, estearato de sorbitano, monoestearato de glicerila, monooleato de glicerila e monoestearato de propilenoglicol.

[0056] O tensoativo hidrofílico preferentemente é selecionado dentre os grupos dos polissorbatos, como polissorbato 20, polissorbato 40, polissorbato 60, polissorbato 80.

[0057] Opcionalmente, o carreador lipídico nanoestruturado inclui um outro lipídio líquido, além do ativo, com ponto de fusão inferior a 20°C, tal como, mas não limitado a ácido oleico, miristato de isopropila, triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, alfa-tocoferol, óleo de oliva, óleo de soja e óleo de rícino.

[0058] Preferentemente, o carreador lipídico nanoestruturado apresenta tamanho entre 50 e 350 nm, índice de polidispersão menor que 0,5 e potencial zeta maior que 30 mV em módulo.

[0059] O processo de obtenção do carreador lipídico nanoestruturado compreende uma primeira etapa de aquecimento e homogeneização da fase oleosa, que inclui o óleo essencial de *Aniba canelilla* (ou 1-nitro-2-feniletano associado ou não ao metileugenol), o lipídio sólido, o tensoativo lipofílico e, opcionalmente, o lipídio líquido. A fase oleosa é aquecida entre 40 e 60°C, sob agitação, por 3 a 8 minutos, garantindo a fusão completa do lipídio sólido.

[0060] Os componentes da fase aquosa, que inclui o tensoativo hidrofílico e a água, são aquecidos sob agitação, entre 40 e 60°C por 3 a 8 minutos.

[0061] As fases oleosa e aquosa são misturadas mediante agitação por 1 a 5 minutos, com a manutenção da temperatura entre 40 e 60°C.

[0062] O aquecimento das fases oleosa e aquosa pode ser realizado em banho de água termostatizado, por exemplo, e a homogeneização sob agitação magnética ou mecânica. Outros mecanismos de aquecimento e/ou homogeneização adequados também podem ser empregados.

[0063] A mistura da fase oleosa e aquosa é cisalhada entre 10.000 a 15.000 rpm, por 1 a 5 minutos, sendo utilizado um dispersor modelo Ultra-Turrax® ou similar. Em etapa seguinte, a mistura é submetida a um homogeneizador à alta pressão por 5 a 8 ciclos, operando entre 650 e 850 bar, sendo mantida a temperatura do entre 40 e 60°C de modo a evitar a solidificação do lipídio sólido.

[0064] Na etapa de resfriamento, a composição é refrigerada a uma temperatura de 2 a 8°C, entre 2 a 6 horas, de modo a promover a solidificação do lipídio sólido, sendo obtido o carreador lipídico nanoestruturado.

[0065] Opcionalmente, ao carreador lipídico nanoestruturado obtido conforme o descrito é adicionado entre 1,0 e 25,0% de um crioprotetor mediante agitação em temperatura ambiente por 30 a 90 minutos.

[0066] Preferentemente, o crioprotetor é selecionado dentre um glicídio, tal como: manitol, sacarose, glicose e trealose.

[0067] Preferentemente, o carreador lipídico nanoestruturado contendo o crioprotetor é congelado, sendo mantido em temperatura entre -15 a -25°C, por 12 a 36 horas.

[0068] Preferentemente, o carreador lipídico nanoestruturado contendo crioprotetor é seco por liofilização, a uma temperatura entre -40 e -60°C, por 24 a 48 horas.

[0069] Opcionalmente, a composição de carreador lipídico nanoestruturado liofilizado é redispersa em um veículo farmacêutico líquido ou semissólido adequado à administração sobre a pele ou sobre as unhas, com pH preferencialmente entre 4,0 e 6,0.

[0070] Preferentemente, o carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em veículo farmacêutico líquido ou semissólido mantém suas propriedades originais, apresentando: tamanho na escala nanométrica, entre 50 e 350 nm, índice de polidispersão menor que 0,5 e potencial zeta maior que 30 mV em módulo.

[0071] Preferentemente, a quantidade de veículo farmacêutico líquido ou semissólido da composição equivale à quantidade de água (em massa) removida durante o processo de liofilização.

[0072] O referido veículo farmacêutico líquido compreende um esmalte aquoso, uma solução aquosa ou uma dispersão aquosa.

[0073] O referido veículo farmacêutico semissólido compreende um gel, um creme, uma loção ou uma pomada.

[0074] A composição de carreador lipídico nanoestruturado liofilizado é redispersa no veículo farmacêutico líquido ou semissólido por agitação, à temperatura ambiente, por 30 a 120 minutos. Para tanto, considera-se que a agitação pode ser magnética, mecânica ou de qualquer outra natureza apropriada. Além disso, o tempo de agitação requerido dependerá das características reológicas e das demais propriedades físico-químicas do veículo farmacêutico, devendo ser suficiente para garantir a obtenção de uma dispersão homogênea.

[0075] A seguir serão demonstradas concretizações específicas da invenção. No entanto, os exemplos aqui apresentados possuem o intuito somente de ilustrar algumas das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, sem limitar o seu escopo. Modificações em torno das concretizações aqui reveladas são sugestivas a um técnico no assunto e inclusas na abrangência da invenção.

Exemplo 1: extração e caracterização do óleo essencial de *Aniba canelilla*

[0076] Para a extração do óleo essencial de *Aniba canelilla* (OEAc), foi utilizado um espécime cujo comprovante foi depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), sob o número 18138.

[0077] As cascas de *Aniba canelilla* foram secas em temperatura ambiente e moídas. Posteriormente, 100 g do material foi submetido à hidrodestilação em um aparato de Clevenger modificado por 4 horas. Decorrida a extração, o aparato de Clevenger foi lavado com diclorometano com o intuito de remover o óleo essencial aderido às paredes do aparato. A mistura foi separada e seca com sulfato de sódio anidro. Após a secagem, o OEAc obtido foi armazenado em um frasco âmbar em um freezer a – 20° C para análises posteriores. O rendimento do procedimento de extração foi de 0,5%.

[0078] O OEAc extraído foi diluído com hexano e analisado em um Cromatógrafo a Gás (5975C) acoplado a um detector de ionização em chama e a um detector de espectrometria de massas (GC-FID/MS, Agilent Technologies, CA, EUA) e equipado com um amostrador automático, utilizando-se um método previamente desenvolvido e validado.

[0079] Os componentes do óleo essencial foram determinados pelos seus tempos de retenção e pelos seus dados de índice retenção linear. O índice de retenção linear (IRL) foi calculado para todos os constituintes voláteis utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos. A identificação dos componentes majoritários do OEAc, 1-nitro-2-feniletano e metileugenol, foi feita pela comparação de seus espectros de massa e IRL com aqueles contidos na base de dados *NIST Mass*

Spectral Search Program 2.0 e na literatura. Além disso, os tempos de retenção obtidos por GC-FID/MS do 1-nitro-2-feniletano e do metileugenol contidos no OEAc foram comparados com o tempo de retenção de um padrão de 1-nitro-2-feniletano isolado (pureza > 99%) e com o tempo de retenção de um padrão comercial de metileugenol (pureza > 98%, Sigma Aldrich, Brasil).

[0080] Dessa maneira, a composição obtida para o OEAc extraído foi a seguinte: 86,637% de 1-nitro-feniletano, 12,7% de metileugenol e 0,663% de benzaldeído, totalizando 100% de compostos identificados.

Exemplo 2: produção de carreadores lipídicos nanoestruturados liofilizados contendo óleo essencial de *Aniba canelilla* e suas redispersões em esmalte aquoso

[0081] Para produção dos carreadores lipídicos nanoestruturados liofilizados contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* e suas posteriores redispersões em um esmalte aquoso (veículo farmacêutico), realizou-se um planejamento estatístico do tipo Delineamento Fatorial Completo 2^3 (com a inclusão de 2 pontos centrais), utilizando-se o *software* Minitab® 17 (State College, PA, USA). O planejamento estatístico mencionado resultou em dez composições a serem preparadas pelo cruzamento das variáveis independentes pré-estabelecidas em diferentes níveis.

[0082] Como variáveis independentes, foram empregados os seguintes fatores e níveis: a concentração de lipídio sólido (X_1), variada nos níveis 5% (-1), 7,5% (0) e 10% (+1); a concentração de crioprotetor (X_2), também variada nos níveis 5% (-1), 7,5% (0) e 10% (+1); e o tempo de redispersão do carreador lipídico nanoestruturado liofilizado no veículo farmacêutico (X_3), variado nos níveis 30 min. (-1), 60 min. (0) e 90 min. (+1). Em que “-1” representa um nível baixo, “0” representa um nível médio” e “+1” representa um nível alto para cada fator estudado. A Tabela 1 apresenta a combinação estatística das variáveis independentes em seus diferentes níveis, a qual resultou em dez diferentes composições, conforme mencionado.

[0083] Tabela 1 - Combinação das variáveis independentes em seus diferentes níveis no Delineamento Fatorial Completo 2^3.

Composição	X_1: Concentração de lipídio sólido (%)	X_2: Concentração de crioprotetor (%)	X_3: Tempo de redispersão (min.)
1	10	5	90
2	7.5	7.5	60
3	10	10	90
4	7.5	7.5	60
5	5	5	90
6	5	10	90
7	5	10	30
8	10	10	30
9	10	5	30
10	5	5	30

[0084] Para preparação das composições, foi empregado o óleo essencial de *Aniba canelilla* contendo majoritariamente 1-nitro-2-feniletano (86,637%) e metileugenol (12,7%), extraído e caracterizado conforme descrito anteriormente. Além disso, as concentrações do óleo essencial de *Aniba canelilla*, do tensoativo lipofílico e do tensoativo hidrofílico foram mantidas fixas. Da mesma forma, os parâmetros de processo adotados para produção do carreador lipídico nanoestruturado liofilizado também foram mantidos fixos. Nesse sentindo, os insumos empregados, bem como suas funções e concentrações estão apresentados na Tabela 2 abaixo.

[0085] Tabela 2 - Insumos e suas concentrações para preparação das dez composições de carreador lipídico nanoestruturado liofilizado no Delineamento Fatorial Completo 2^3.

Insumo	Função	Concentração (m/m)
Óleo essencial de *Aniba canelilla* constituído de 1-nitro-	Composto ativo e lipídio líquido	10%

2-feniletano e metileugenol		
Manteiga de tucumã	Lipídio sólido	Variada nos níveis 5, 7,5 e 10%
Oleato de sorbitano	Tensoativo lipofílico de alto EHL	2,5%
Polissorbato 20	Tensoativo hidrofílico de alto EHL	2,5%
Água*	Dispersante	Quantidade suficiente para 100%
Manitol**	Crioprotetor	Variada nos níveis 5, 7,5 e 10%

[0086] *Removida no processo de liofilização; **Adicionado após a formação do carreador lipídico nanoestruturado, previamente à etapa de liofilização; Manteiga de tucumã (lipídio sólido) corresponde ao X_1 do Delineamento Fatorial Completo 2^3; Manitol (crioprotetor) corresponde ao X_2 do Delineamento Fatorial Completo 2^3.

[0087] O processo de preparação das dez composições será descrito a seguir. As matérias-primas foram pesadas conforme concentrações abordadas na Tabela 2.

[0088] Aquecimento e homogeneização da fase oleosa: a fase oleosa, constituída pelo óleo essencial de *Aniba canelilla*, pela manteiga de tucumã e pelo oleato de sorbitano, foi aquecida em banho termostatizado a 45º C sob agitação magnética por 5 minutos, garantindo a completa fusão do lipídio sólido.

[0089] Aquecimento e homogeneização da fase aquosa: paralelamente e de maneira similar, a fase aquosa, constituída pelo polissorbato 20 e pela água, foi aquecida em banho termostatizado a 45º C sob agitação magnética por 5 minutos.

[0090] Vertimento de uma fase sobre a outra: A fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, sendo mantida a agitação magnética por mais 3 minutos e a temperatura de 45ºC em banho termostatizado.

[0091] Agitação a alto cisalhamento: as composições foram submetidas ao dispersor Ultra-turrax® (T8, IKA, Alemanha) a 13.500 rpm por 1 minuto.

[0092] Homogeneização à alta pressão: em seguida, as composições foram levadas ao Homogeneizador à Alta Pressão (Emulsiflex-C®, Avestin, Canadá), o qual operou a 750 bar por 6 ciclos. Durante esse processo, a temperatura do sistema foi mantida a 45°C, com o intuito de evitar a solidificação do lipídio sólido.

[0093] Resfriamento: as composições foram refrigeradas a 4°C por 4 horas, de modo a propiciar a solidificação do lipídio sólido.

[0094] Adição do crioprotetor: o manitol foi adicionado mediante agitação magnética por 60 minutos, à temperatura ambiente, garantindo sua completa solubilização.

[0095] Congelamento: as composições foram congeladas entre -20 ± 5°C por 24 horas.

[0096] Liofilização: posteriormente, foram submetidas ao processo de liofilização no equipamento Liofilizador (MicroModulyo, Savant Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA), o qual operou a -50°C por 24 horas. Ao término dessa etapa, foram obtidas as composições de carreador lipídico nanoestruturado liofilizado.

[0097] Como veículo farmacêutico para redispersão do carreador lipídico nanoestruturado liofilizado, foi utilizado um esmalte aquoso contendo o polímero Eudragit® e os demais aditivos necessários desprovido de solventes orgânicos. O tempo de redispersão do carreador lipídico nanoestruturado no veículo farmacêutico (X3) foi variado em 30, 60 e 90 minutos, compreendendo uma das variáveis independentes do Delineamento Fatorial Completo 2^3, conforme abordado na Tabela 1. A redispersão se deu por agitação magnética em temperatura ambiente e a quantidade de veículo farmacêutico utilizada foi a mesma quantidade (em massa) de água removida pelo processo de liofilização.

[0098] As dez composições obtidas de carreador lipídico nanoestruturado liofilizado disperso em esmalte aquoso foram avaliadas quanto: ao tamanho de partícula (Y_1) em nm; ao índice de polidispersão (Y_2); ao potencial zeta (Y_3) em mV; a eficiência de encapsulamento, expressa para o 1-nitro-2-feniletano (Y_4) e

para o metileugenol (Y_5) em %; ao teor, expresso para o 1-nitro-2-feniletano (Y_6) e para o metileugenol (Y_7) em mg/g; e ao carreamento do composto ativo, expresso para o 1-nitro-2-feniletano (Y_8) e para o metileugenol (Y_9) em %. Todos esses parâmetros (Y_1 a Y_9) constituíram as variáveis dependentes do Delineamento Fatorial Completo 2^3 e foram analisadas estatisticamente por meio do *software* Minitab® 17 (State College, PA, USA). Dessa maneira, foi possível avaliar o impacto das variáveis independentes (X_1 a X_3) sobre as variáveis dependentes (Y_1 a Y_9). A metodologia adotada para determinação das variáveis dependentes mencionadas, assim como os resultados obtidos para cada composição estão apresentados no tópico subsequente.

Exemplo 3: caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados liofilizados contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* redispersos em esmalte aquoso

[0099] O tamanho de partícula (nm) e o índice de polidispersão foram determinados em triplicada pelo método de espalhamento de luz dinâmico a 25°C, utilizando-se o equipamento Nanosizer® ZS90 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas 1000 vezes em água ultrapurificada e filtradas em 0,22 µm. Os resultados foram expressos como a média das três determinações. O potencial zeta (mV) foi determinado em triplicata pelo princípio da mobilidade eletroforética a 25°C utilizando-se o mesmo equipamento, sendo as amostras preparadas por diluição a 1000 vezes em solução de NaCl 0,1 mM e filtradas em 0,22 µm. Os resultados foram também expressos como a médias das três determinações.

[0100] Para determinação do teor (mg/g) de 1-nitro-2-feniletano e de metileugenol utilizou-se um Cromatógrafo a Gás (Shimadzu GC 2010, Kyoto, Japão) de injetor manual *split*/*splitless*, equipado com detector de ionização em chama (FID). A extração dos analitos da amostra ocorreu por microextração em fase sólida (*headspace*). As condições de operação adotadas seguiram as especificações de um método previamente desenvolvido e validado de acordo com guias internacionais.

[0101] A injeção foi feita no modo *splitless* e o sistema cromatográfico foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). O gás de arraste foi o nitrogênio a um fluxo de 1 mL/min e a uma velocidade linear de 40 cm/s. A temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: de 60ºC para 155ºC a 15°C/min., de 155°C para 165°C a 3°C/min. e de 165ºC a 260°C a 40°C/min., finalizando a corrida cromatográfica em 14 minutos. A temperatura do injetor e do detector foram fixadas em 250ºC e 300°C, respectivamente. O sinal foi processado com o *software LabSolutions GC-Solution.*

[0102] Para microextração em fase sólida dos analitos, foi utilizado um suporte manual e uma fibra revestida de polidimetilsiloxano de 100 µm de espessura (Sigma–Aldrich, São Paulo, Brasil). De modo a propiciar a volatilização e adsorção dos analitos à fibra, foi adicionado 5% (massa/volume) de NaCl às amostras, as quais foram então aquecidas a 53°C em banho termostatizado e simultaneamente agitadas em agitador magnético por 21 minutos, utilizando-se um *vial* selado com septo. Decorrido os 21 minutos, a fibra foi removida do *vial* e inserida na porção de injeção do cromatógrafo. O tempo dessorção dos analitos foi de 4 minutos.

[0103] As amostras foram preparadas diluindo-se 250 mg de composição em metanol, seguida de uma diluição em água ultrapurificada, retirando-se 1 mL da última solução obtida para análise (microextração em fase sólida seguida de cromatografia gasosa).

[0104] A eficiência de encapsulamento (%) e o carreamento do composto ativo (%) foram determinados por um método indireto, sendo doseada a quantidade de 1-nitro-2-feniletano e de metileugenol na fase aquosa da composição. Para tanto, foi realizada uma centrifugação-ultrafiltração utilizando um filtro de centrífuga (Amicon® Ultra 15, Millipore) com peso molecular de corte de 100 kDa. Um volume de 0,5 mL de composição foi inserido no compartimento interno de um tubo de centrífuga e centrifugado a 4000 rpm por 1,5 horas a 4°C. Os analitos livres na fase aquosa foram coletados no compartimento externo da

unidade filtrante do tubo de centrífuga, diluídos e quantificados por Cromatografia Gasosa, adotando-se o mesmo procedimento descrito acima para determinação do teor.

[0105] A eficiência de encapsulamento (EE), que corresponde a quantidade de composto retido na matriz lipídica (nanoencapsulado) em relação à quantidade total de composto contido na composição, foi calculada por meio da Equação 1.

[0106] Equação 1: EE (%) do 1-nitro-2-feniletano ou metileugenol = $\left(\frac{(Qcomposto\ total - Qcomposto\ livre)}{Q\ composto\ total}\right) \times 100$

[0107] Onde:

[0108] *Qcomposto total* corresponde à quantidade total do composto doseado na composição;

[0109] *Qcomposto livre* corresponde à quantidade de composto doseado na fase aquosa.

[0110] O carreamento do composto ativo, que corresponde ao percentual da quantidade de composto carreado na matriz lipídica em relação à quantidade de composto inicialmente adicionado para preparar o nanosistema, foi calculado conforme a Equação 2.

[0111] Equação 2: Carreamento (%) do 1-nitro-2-feniletano ou metileugenol = $\left(\frac{(Qcomposto\ total - Qcomposto\ livre)}{Q\ composto\ adicionado\ inicialmente}\right) \times 100$

[0112] Onde:

[0113] *Qcomposto total* corresponde à quantidade total do composto doseado na composição;

[0114] *Qcomposto livre* corresponde à quantidade de composto doseado na fase aquosa;

[0115] *Qcomposto adicionado inicialmente* corresponde à quantidade pesada de composto para o preparo do nanosistema.

[0116] Os resultados obtidos foram submetidos à avaliação estatística por Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey (nível de significância: $p \leq 0.05$) utilizando-se o *software* Minitab® 17 (State College, PA, USA). O modelo

matemático que melhor se adequava aos resultados foi selecionado com base no valor de p. A significância para cada resposta foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) da equação polinomial da regressão capaz de descrever a relação das variáveis independentes, considerando os termos individuais e suas interações. Adicionalmente, Gráficos de Pareto e de Efeitos Principais para cada variável dependente estudada foram plotados com o intuito de suportar os resultados da equação polinomial, os quais estão apresentados nas Figuras.

[0117] Os resultados das variáveis dependentes (Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5, Y_6, Y_7, Y_8 e Y_9) obtidos para as dez composições produzidas no Delineamento Fatorial Completo 2^3, estão expressos na Tabela 3 abaixo, na qual também pode-se observar as respectivas variáveis independentes (X_1, X_2 e X_3) que geraram esses resultados.

[0118] Tabela 3 - Resultados obtidos para as variáveis dependentes avaliadas no Delineamento Fatorial Completo 2^3.

Compo-sição	**Variáveis independentes**			**Variáveis dependentes**								
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9
1	10	5	90	147.144	0.336	-69.60	100	100	41.87	6.60	49.59	53.36
2	7.5	7.5	60	126.45	0.223	-63.45	100	100	26.89	5.08	31.65	43.86
3	10	10	90	137.478	0.256	-69.08	100	100	36.53	6.11	43.27	49.43
4	7.5	7.5	60	129.93	0.212	-65.21	100	100	27.14	5.19	32.24	45.12
5	5	5	90	119.756	0.125	-69.02	100	100	16.11	4.42	20.79	38.99
6	5	10	90	119.378	0.124	-68.02	100	100	15.60	3.98	20.13	35.04
7	5	10	30	116.222	0.126	-66.77	100	100	19.69	4.83	25.42	42.52
8	10	10	30	134.278	0.292	-60.88	100	100	33.31	5.54	39.45	44.82
9	10	5	30	135.689	0.305	-64.76	100	100	32.90	5.46	38.96	44.14
10	5	5	30	117.444	0.160	-65.31	100	100	22.70	5.03	29.30	44.30

[0119] X_1: concentração de lipídio sólido (%); X_2: concentração de crioprotetor (%); X_3: tempo de redispersão do carreador lipídico nanoestruturado liofilizado (min); Y_1: tamanho de partícula (nm); Y_2: índice de polidispersão; Y_3: potencial zeta (mV); Y_4: eficiência de encapsulamento do 1-nitro-2-feniletano (%); Y_5: eficiência de encapsulamento do metileugenol (%); Y_6: Teor de 1-nitro-2-

feniletano (mg/g); Y_7: Teor de metileugenol (mg/g); Y_8: Carreamento do 1-nitro-2-feniletano (%); Y_9: Carreamento do metileugenol (%).

[0120] Conforme pode ser observado na Tabela 3, o tamanho de partícula (Y_1) para as composições produzidas apresentou valores que variaram de 116 a 147 nm, não sendo influenciado por nenhuma variável independente estudada (X_1, X_2 e X_3), o que é confirmado pelo Gráfico de Pareto plotado (Figura 1A), uma vez que o modelo proposto não apresentou um valor de p significativo ($p > 0,05$). Apesar disso, o Gráfico de Efeitos Principais para tamanho de partícula (Figura 1B) demonstra uma tendência de aumento nesse parâmetro quando uma maior concentração de lipídio sólido (X_1) é adicionada ao nanosistema, o que pode ser atribuído justamente a uma maior quantidade de lipídio sólido incorporada na fase dispersa. Pelo reduzido tamanho de partícula que as composições apresentaram (de 116 a 147 nm), pode-se inferir que as mesmas apresentam alto potencial de permeação, propriedade importante quando se visa as vias de administração cutânea e ungueal.

[0121] O índice de polidispersão (IPD) (Y_2) variou de 0,124 a 0,336 para as composições preparadas e, baseado na regressão fatorial e no Gráfico de Pareto (Figura 2A), esse parâmetro é influenciado pela concentração de lipídio sólido (X_1) (valor de $p < 0,021$). Um maior IPD foi encontrado para as composições que continham um maior percentual de lipídio sólido, conforme pode ser visualizado na Tabela 3 e no Gráfico de Efeitos Principais (Figura 2B), o que provavelmente ocorreu pelo aumento no tamanho de partícula desses nanosistemas. Valores de IPD entre 0,1 a 0,25 indicam uma distribuição estreita no tamanho das nanopartículas, favorecendo uma estabilidade de longa duração para dispersões nanométricas. Por outro lado, valores de IPD acima de 0,5 sugerem uma ampla distribuição no tamanho das nanopartículas, sendo um indicativo de instabilidade do nanosistema. Sendo assim, uma monodispersão é sugerida para todas as composições preparadas, considerando um IPD abaixo de 0,35, indicando homogeneidade no tamanho das nanopartículas, o que é desejável em termos de estabilidade.

[0122] O potencial zeta (Y_3) para as composições produzidas compreendeu a faixa de -60,8 mV a -69,9 mV, sugerindo estabilidade física. Adicionalmente, como pode ser notado no Gráfico de Pareto (Figura 3A), essa variável dependente não foi influenciada por nenhum parâmetro de formulação e de processo estudado (X_1, X_2 e X_3), uma vez que não foi detectada significância estatística no modelo fatorial proposto (valor de p >0,05). Apesar de uma relação sugestiva entre o aumento do tempo de redispersão e o aumento do potencial zeta em módulo no Gráfico de Efeitos Principais (Figura 3B), nenhuma significância estatística foi detectada (p > 0,05). O potencial zeta interfere na estabilidade física de sistemas dispersos, sendo que, quanto maior o seu valor em módulo, maior é a repulsão eletrostática e a distância das nanopartículas e, portanto, maior é a estabilidade do nanosistema.

[0123] A eficiência de encapsulamento (Y_4 e Y_5) para ambos os componentes majoritários do óleo essencial de *Aniba canelilla*, 1-nitro-2-feniletano e metileugenol, foi de 100% para todas as composições produzidas, de acordo com o exposto na Tabela 3. Tal resultado significa que a quantidade total de 1-nitro-2-feniletano e de metileugenol contida na composição encontra-se incorporada à matriz lipídica, não havendo a presença desses compostos na fase aquosa, o que é desejável pois devem estar aprisionados à nanopartícula lipídica para estarem protegidos da volatilização e de fatores ambientais externos. A alta eficiência de encapsulamento obtida pode ser atribuída à lipofilicidade do 1-nitro-2-feniletano e do metileugenol. Os Gráficos de Pareto e de Efeitos Principais não foram gerados para variáveis dependentes eficiência de encapsulamento do 1-nitro-2-feniletano (Y_4) e do metileugenol (Y_5), tendo em vista que os resultados foram iguais para todas as composições preparadas (100%).

[0124] O teor de 1-nitro-2-feniletano (Y_6), conforme pode-se visualizar no Gráfico de Pareto (Figura 4A), foi afetado pelas seguintes variáveis independentes, as quais apresentaram significância estatística (valor de p <0,05): concentração de lipídio sólido (X_1), concentração de crioprotetor (X_2), interação

entre a concentração de lipídio sólido (X_1) e o tempo de redispersão (X_3) e interação entre a concentração de lipídio sólido (X_1), a concentração de crioprotetor (X_2) e o tempo de redispersão (X_3). O teor de ME (Y_7), por sua vez, foi influenciado pelas variáveis independentes: concentração de lipídio sólido (X_1) e interação entre a concentração de lipídio sólido (X_1) e o tempo de redispersão (X_3) (valor de $p < 0,05$), conforme pode-se observar no Gráfico de Pareto (Figura 5A).

[0125] Os Gráficos de Efeitos Principais para o teor de 1-nitro-2-feniletano (Figura 4B) e de metileugenol (Figura 5B) indicam que quanto maior a concentração de lipídio sólido, maior o teor desses componentes, o que pode ser atribuído à maior capacidade de solidificação das nanopartículas e, consequentemente, de imobilização dos compostos incorporados.

[0126] O carreamento de 1-nitro-2-feniletano (Y_8) foi afetado de maneira estatisticamente significativa pela concentração de lipídio sólido (X_1) e pela interação entre a concentração de lipídio sólido (X_1) e o tempo de redispersão (X_3) (valor de $p < 0,05$), conforme demonstrado no Gráfico de Pareto (Figura 6A). De maneira complementar, o Gráfico de Efeitos Principais para o 1-nitro-2-feniletano (Figura 6B) demonstra um aumento do carreamento desse componente à medida do aumento da concentração de lipídio sólido.

[0127] O carreamento de metileugenol (Y_9), por outro lado, não foi afetado por nenhuma das variáveis independentes estudadas (concentração de lipídio sólido, concentração de crioprotetor e tempo de redispersão, X_1, X_2 e X_3, respectivamente), considerando o valor de $p > 0,05$ obtido e conforme pode-se visualizar no Gráfico de Pareto (Figura 7A). Todavia, no Gráfico de Efeitos Principais (Figura 7B) é possível observar uma tendência no aumento do carreamento do metileugenol à medida do aumento da concentração de lipídio sólido (X_1), assim como constatado para o 1-nitro-2-feniletano.

[0128] Por fim, as variáveis independentes do Delineamento Fatorial Completo 2^3, sendo elas: a concentração de lipídio sólido (X_1), a concentração de crioprotetor (X_2) e o tempo de redispersão (X_3), foram otimizadas

estatisticamente por meio de uma função de desejabilidade utilizando-se o *software* Minitab® 17 (State College, PA, USA), objetivando constatar quais os valores de X_1, X_2 e X_3 que geraram os melhores resultados para as variáveis dependentes. Para tanto, considerou-se: uma resposta maximizada para o teor e para o carreamento de 1-nitro-2-feniletano e de metileugenol (ME) (Y_6, Y_7, Y_8 e Y_9); uma resposta minimizada para o tamanho de partícula (Y_1) e para o índice de polidispersão (Y_2); e uma resposta maximizada para o potencial zeta (Y_3) em módulo. A eficiência de encapsulamento (Y_4 e Y_5) não foi considerada para otimização, uma vez que se apresentou em 100% para todas as composições preparadas, tanto para o 1-nitro-2-feniletano quanto para o metileugenol. Um peso de 2 e de 3 foi atribuído ao teor de 1-nitro-2-feniletano e de metileugenol e ao carreamento de 1-nitro-2-feniletano e de metileugenol, respectivamente, considerando que esses parâmetros impactam diretamente na eficácia da composição.

[0129] Dessa maneira, a composição 3 (Tabela 3) foi a que gerou os melhores resultados para as variáveis dependentes estudadas, a qual foi produzida contendo 10% de lipídio sólido (X_1) e 10% de crioprotetor (X_2) e redispersa em veículo farmacêutico por um tempo 90 minutos (X_3). As variáveis dependentes obtidas para composição 3, preparada conforme as condições mencionadas, foram: tamanho de partícula (Y_1) de 137,48 nm; índice de polidspersão (Y_2) de 0,256; potencial zeta (Y_3) de -69,09; eficiência de encapsulamento do 1-nitro-2-feniletano (Y_4) de 100%; eficiência de encapsulamento para o metileugenol (Y_5) de 100%; teor de 1-nitro-2-feniletano (Y_6) de 36,53 mg/g; teor de metileugenol (Y_7) de 6,11 mg/g; carreamento de 1-nitro-2-feniletano (Y_8) de 43,27%; e carreamento de metileugenol (Y_9) de 49,43%. Essas condições apresentaram um valor de desejabilidade de 0,5250, o qual é considerado apropriado, tendo em vista que a função de desejabilidade (D) compreende uma escala de 0 a 1, em que 1 é o valor ideal.

[0130] Nesse sentido, os resultados obtidos e aqui expostos demonstram a viabilidade da presente invenção, no que tange a sua composição, ao seu

processo de preparação e às suas características físico-químicas. O carreador lipídico nanoestruturado contendo o óleo essencial de *Aniba canelilla* (constituído majoritariamente de 1-nitro-2-feniletano e metileugenol) após ser liofilizado e redisperso em esmalte aquoso, apresentou características de qualidade desejáveis.

Exemplo 4: ensaio *in vitro* de concentração inibitória mínima com fungos dermatófitos

[0131] De maneira a constatar a atividade antifúngica frente a fungos dermatófitos do óleo essencial de *Aniba canelilla* (OEAc) e do 1-nitro-2-feniletano, seu principal constituinte, foi realizado um ensaio *in vitro* de concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo, adotando o preconizado pelo Protocolo M38-A2 do CLSI para fungos filamentosos (CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard – Second Edition. **CLSI Document M38-A2**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

[0132] Para tanto, foi testado o OEAc contendo 1-nitro-2-feniletano (86,637%) e metileugenol (12,7%), extraído e caracterizado de acordo com o exposto no item ***Exemplo 1: Extração e caracterização do óleo essencial de Aniba canelilla***, e um padrão de alta pureza (100%) de 1-nitro-2-feniletano isolado.

[0133] Para este ensaio, foram utilizadas quatro cepas clínicas isoladas de *Trichophyton mentagrophytes* (denominadas TME 40, TME 60, TME 46 e TME 1), três cepas clínicas isoladas de *Trichophyton rubrum* (denominadas TRU 45, TRU 51 e TRU 47) e duas cepas clínicas isoladas de *Microsporum canis* (denominadas MCA 29 e MCA 38), totalizando nove cepas clínicas isoladas de três diferentes espécies causadoras de infecções fúngicas ungueais.

[0134] Diluições seriadas foram realizadas em meio de cultura RPMI 1640, de modo a atingir diferentes concentrações para o OEAc e para o 1-nitro-2-feniletano. Os experimentos foram executados em triplicata. A concentração inibitória mínima foi definida como a concentração mais baixa do composto em

que os microrganismos testados não demonstraram crescimento visível após 96 horas. O fármaco ciclopirox olamina foi empregado como antifúngico de referência para fungos dermatófitos. O controle negativo para esterilidade (meio isento de fármaco) e o controle positivo para viabilidade celular fúngica foram realizados em paralelo.

[0135] A Tabela 4 abaixo aborda os resultados de concentração inibitória mínima (µg/mL) obtidos para o OEAc e para o 1-nitro-2-feniletano, considerando as nove cepas clínicas isoladas de fungos dermatófitos que foram testadas.

[0136] Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (µg/mL) do óleo essencial de *Aniba canelilla* e do 1-nitro-2-feniletano contra fungos dermatófitos.

Dermatófito (n=9)	OEAc	1N2FE	CPX
TME 60	256	221,7	2
TME 40	128	110,8	2
TME 1	256	221,7	1
TME 46	64	27,7	1
TRU 45	32	55,4	2
TRU 51	32	27,7	2
TRU 47	128	110,8	1
MCA 29	>256	>221,7	1
MCA 38	64	27,7	1

[0137] OEAc: óleo essencial de *Aniba canelilla*; 1N2FE: 1-nitro-2-feniletano; CPX: ciclopirox olamina; TME: *Trichophyton mentagrophytes*; TRU: *Trichophyton rubrum*; MCA: *Microsporum canis*.

[0138] De acordo com os dados apresentados, o OEAc foi capaz de inibir o crescimento dos fungos dermatófitos isolados testados, com uma concentração inibitória mínima variando de 32 a 128 µg/mL para o *Trichophyton rubrum*, de 64 a 256 µg/mL para o *Trichophyton mentagrophytes* e de 64 µg/mL para o *Microsporum canis* (MCA 38).

[0139] Da mesma forma, o 1-nitro-2-feniletano também foi capaz de inibir o crescimento dos fungos dermatófitos isolados testados, com uma

concentração inibitória mínima variando de 27,7 a 110,8 µg/mL para o *Trichophyton rubrum*, de 27,7 a 221,7 µg/mL para o *Trichophyton mentagrophytes* e de 27,7 µg/mL para o *Microsporum canis* (MCA 38).

[0140] Tais resultados confirmam a atividade antifúngica do OEAc (contendo majoritariamente 1-nitro-2-feniletano e metileugenol) e do 1-nitro-2-feniletano (isolado) contra fungos causadores de dermatofitoses e onicomicoses.

Exemplo 5: ensaio *ex vivo* em unhas suínas infectadas com fungo dermatófito

[0141] Com o intuito de comprovar a atividade antifúngica frente a onicomicoses das composições de carreador lipídico nanoestruturado objetos da presente invenção e do óleo essencial de *Aniba canelilla* (OEAc), contendo majoritariamente o 1-nitro-2-feniletano e o metileugenol, procedeu-se um ensaio *ex vivo* em unhas suínas infectadas com um fungo dermatófito, baseado na metodologia descrita por Quatrin *et al*. (QUATRIN, P. M. *et al*. *Ex vivo* nail infection as an effective preclinical method for screening of new topical antifungals. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 2, p. 100938, 2020).

[0142] Para a execução desse ensaio, discos de 9,5 mm de diâmetro e de 1 mm de espessura foram formados a partir de cascos suínos. Em seguida, os discos obtidos foram colocados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose e infectados com uma cepa clínica isolada de *Trichophyton rubrum* (denominada TRU 47), principal agente causador de onicomicoses, por meio da inoculação de 100 µL de uma suspensão fúngica a 10^5 UFC/mL, seguida da incubação em estufa a 32°C por 5 dias. Dessa forma, obteve-se um modelo *ex vivo* de onicomicoses, visando simular o que ocorre com as unhas humanas quando acometidas por essa doença.

[0143] Decorrido o período de incubação mencionado, os discos (de casco suíno) infectados foram transferidos para um meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose, e pipetou-se diariamente, por 7 dias, 20 µL de amostra teste (detalhadas posteriormente) sobre cada disco infectado. Considerou-se 3 discos por amostra teste, sendo armazenados em um mesmo meio de cultura. Os meios

de cultura foram mantidos em estufa a 32°C durante todo o período de tratamento, isto é, durante todo o período que receberam a amostra teste. Para execução do ensaio, considerou-se um controle positivo, no qual os discos foram infectados e não receberam nenhum tratamento (nenhuma amostra teste foi pipetada), e um controle negativo, no qual os discos não foram infectados e nem receberam tratamento.

[0144] Transcorridos os 7 dias, cada disco foi transferido individualmente para um tubo contendo 2 mL de solução salina, o qual foi passado em vórtex por 1 minuto e em banho ultrassônico por 20 minutos. Em seguida, pipetou-se 20 µL da solução salina em Ágar Batata Dextrose. Os 20 µL de soluções salinas utilizadas para lavagem de discos de uma mesma amostra teste foram pipetados para um mesmo meio de cultura. Os meios de cultura foram então incubados a 32° C por 5 dias. Após o período de incubação, realizou-se a contagem das células fúngicas (UFC) e calculou-se o percentual de remoção das células fúngicas das amostras teste em relação ao controle positivo.

[0145] Por fim, após submetidos ao processo de lavagem em solução salina, conforme abordado, os discos foram recolocados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose, sendo incubados a 32°C por 3 dias para análise da recidiva, isto é, se haveria o crescimento fúngico após o período de tratamento. Nesse caso, o crescimento fúngico foi avaliado visualmente.

[0146] Para realização do ensaio descrito, foram utilizadas as seguintes amostras teste: (1) o OEAc contendo majoritariamente 1-nitro-2-feniletano (86,637%) e metileugenol (12,7%), extraído e caracterizado conforme o apresentado no item ***Exemplo 1: Extração e caracterização do óleo essencial de Aniba canelilla***, diluído a 10% com óleo mineral (insumo inerte), de modo a estar na mesma concentração das composições de carreador lipídico nanoestruturado; (2) o carreador lipídico nanoestruturado; (3) o carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em água; e (4) o carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em esmalte aquoso (contendo Eudragit®).

[0147] Todas as três composições de carreador lipídico nanoestruturado mencionadas (amostras teste de 2 a 4) continham em sua composição 10% do OEAc (o qual possuía 86,637% de 1-nitro-2-feniletano e 12,7% de metileugenol) extraído e caracterizado conforme o apresentado no item ***Exemplo 1: Extração e caracterização do óleo essencial de Aniba canelilla***. Ademais, as composições de carreador lipídico nanoestruturado foram preparadas conforme o abordado no item ***Exemplo 2: Produção de carreadores lipídicos nanoestruturados liofilizados contendo óleo essencial de Aniba canelilla e suas redispersões em esmalte aquoso***, contendo, além do referido óleo essencial, 10% de manteiga de tucumã, 2,5% de oleato de sorbitano e 2,5% de polissorbato 20. Ademais, as composições liofilizadas foram acrescidas de 10% de manitol previamente à secagem e foram posteriormente redispersas no veículo farmacêutico por 90 minutos.

[0148] Os resultados do ensaio *ex vivo* estão apresentados na Tabela 5 abaixo, sendo expressos em percentual de remoção das células fúngicas de *Trichophyton rubrum* (inóculo de 100 µL a 10^5 UFC/mL) em relação ao grupo controle positivo, no qual os discos foram infectados e não receberam nenhum tratamento. O controle negativo não apresentou crescimento fúngico, conforme esperado, considerando que seus discos não foram infectados.

[0149] Tabela 5 - Percentual de remoção das células fúngicas de *Trichophyton rubrum* (inóculo de 100 µL a 10^5 UFC/mL) para as amostras teste em relação ao controle positivo.

Amostra teste (grupo)	**Remoção das células fúngicas**
Óleo essencial de *Aniba canelilla* diluído a 10%	97,44%
Carreador lipídico nanoestruturado	100%
Carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em água	94,45%
Carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em esmalte aquoso	86,76%

[0150] Conforme apresentado na Tabela 5, todas as amostras teste consideradas para o ensaio se mostraram eficazes para o combate das células fúngicas em um modelo *ex vivo* de onicomicoses, tendo em vista que apresentaram altos percentuais de remoção. Tais resultados evidenciam o potencial antifúngico da invenção para o tratamento tópico de onicomicoses.

[0151] O OEAc foi capaz de eliminar 97,44% das células fúngicas, mesmo diluído a uma concentração de 10%, o que comprova a sua atividade antifúngica, podendo-se inferir que é um ativo promissor a ser veiculado em composições farmacêuticas tópicas para o tratamento de onicomicoses. Tal achado é atribuído ao seu componente majoritário, o 1-nitro-2-feniletano, o qual, dessa forma, também apresenta potencial a ser utilizado como ativo antifúngico, isoladamente ou em combinação com o metileugenol.

[0152] A composição de carreador lipídico nanoestruturado (não liofilizada) demonstrou percentual de remoção de células fúngicas de 100%, ou seja, foi capaz de combater todas as células fúngicas infectantes dos discos. Tal resultado indica que a veiculação do óleo essencial utilizado e/ou de seus componentes predominantes em um nanosistema lipídico é uma abordagem adequada. Além disso, a composição de carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em água apresentou percentual de remoção de células fúngicas de 94,45%, assegurando que o processo de liofilização e posterior redispersão não compromete a atividade antifúngica das nanopartículas.

[0153] O carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em esmalte aquoso apresentou menor percentual de remoção das células fúngicas, mas ainda indicativo de eficácia (86,76%), em relação aos grupos carreador lipídico nanoestruturado (100%) e carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em água (94,45%). Provavelmente, esse achado se deve à composição polimérica da base de esmalte, que pode acarretar a liberação mais lenta das nanopartículas da forma farmacêutica.

[0154] Quanto à análise da recidiva, não houve crescimento fúngico nos discos de casco suíno tratados com o OEAc diluído a 10%, conforme pode ser

visualizado na Figura 8A, a qual pode ser comparada com a Figura 8B, que apresenta o crescimento fúngico nos discos do controle positivo, e com a Figura 8C, que demonstra a ausência de crescimento fúngico os discos do controle negativo. Nesse sentido, novamente pode-se perceber o potencial antifúngico desse óleo essencial e de seu componente majoritário.

[0155] Além disso, na análise da recidiva, também não houve crescimento fúngico nos discos tratados com a composição carreador lipídico nanoestruturado, conforme demonstrado na Figura 9A, a qual pode ser comparada com a Figura 9B, que apresenta o crescimento fúngico nos discos do controle positivo, e com a Figura 9C, que demonstra a ausência de crescimento fúngico nos discos do controle negativo. Esse resultado corrobora com os 100% de remoção das células fúngicas para esse grupo, de acordo com o apresentado anteriormente.

[0156] Para os discos tratados com carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em água e carreador lipídico nanoestruturado liofilizado redisperso em base de esmalte aquosa, houve crescimento fúngico na análise de recidiva, o que ocorreu, provavelmente, devido aos menores percentuais de remoção de células fúngicas que apresentaram, mesmo que significativos, em comparação com os dois outros grupos.

[0157] Entretanto, o crescimento fúngico na análise da recidiva pode ser atribuído ao fato de que se faz necessário um maior período de tratamento com essas composições e/ou uma maior dose diária, tendo em vista que nesse ensaio foi pipetado apenas 20 µL de amostra teste, uma vez ao dia, por 7 dias sobre os discos infectados.

[0158] Nesse sentido, os resultados apresentados demonstram o potencial antifúngico da invenção e de seus ativos frente a fungos dermatófitos.

Reivindicações

1. COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO **caracterizada por** incluir:

a. um carreador lipídico nanoestruturado apresentando tamanho entre 50 e 350 nm, índice de polidispersão menor que 0,5 e potencial zeta maior que 30 mV em módulo, o qual inclui:

i. entre 1,0 e 25,0% de um lipídio sólido;

ii. entre 1,0 e 8,0% de um tensoativo lipofílico não iônico com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre 3 e 6;

iii. entre 1,0 e 8,0% de um tensoativo hidrofílico não iônico com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre 8 e 18;

iv. entre 1,0 e 25,0% de um lipídio líquido selecionado dentre uma matéria-prima lipídica com ponto de fusão inferior a 20°C;

v. água em q.s.p.;

b. entre 1,0 e 25,0% p/p do óleo essencial de *Aniba canelilla* (Kunth) Mez constituído de 1-nitro-2-feniletano.

2. COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO **caracterizada por** incluir:

a. um carreador lipídico nanoestruturado apresentando tamanho entre 50 e 350 nm, índice de polidispersão menor que 0,5 e potencial zeta maior que 30 mV em módulo, o qual inclui:

i. entre 1,0 e 25,0% de um lipídio sólido;

ii. entre 1,0 e 8,0% de um tensoativo lipofílico não iônico com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre 3 e 6;

iii. entre 1,0 e 8,0% de um tensoativo hidrofílico não iônico com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) entre 8 e 18;

iv. entre 1,0 e 25,0% de um lipídio líquido selecionado dentre uma matéria-prima lipídica com ponto de fusão inferior a 20°C;

v. água em q.s.p.;

b. entre 1,0 e 25,0% p/p de 1-nitro-2-feniletano.

3. COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada por** incluir entre 1,0 e 25,0% p/p de metileugenol.

4. COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO, de acordo com as reivindicações 2 e 3, **caracterizada pelo** fato do 1-nitro-2-feniletano e do metileugenol serem obtidos a partir do óleo essencial extraído da planta *Aniba canelilla* (Kunth) Mez.

5. COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizada pelo** fato de o lipídio sólido compreender qualquer matéria-prima lipídica com ponto de fusão superior a 30°C.

6. COMPOSIÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizada pelo** fato de incluir entre 1,0 e 25,0% de um crioprotetor selecionado dentre um glicídio e pelo fato de ser liofilizada.

7. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO adicionado nas composições reivindicadas em 1 e 2, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a. aquecimento e homogeneização da fase oleosa entre 40 e 60°C, sob agitação, por 3 a 8 minutos;

b. aquecimento e homogeneização da fase aquosa entre 40 e 60°C por 3 a 8 minutos;

c. mistura das fases oleosa e aquosa mediante agitação por 1 a 5 minutos, com a manutenção da temperatura entre 40 e 60°C;

d. cisalhamento da mistura das fases oleosa e aquosa entre 10.000 e 15.000 rpm, por 1 a 5 minutos;

e. homogeneização à alta pressão da mistura das fases oleosa e aquosa por 5 a 8 ciclos, entre 650 e 850 bar, sendo mantida a temperatura entre 40 e 60°C;

f. resfriamento à temperatura de 2 a 8°C, entre 2 e 6 horas.

8. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** incluir as seguintes etapas necessárias à obtenção de um carreador lipídico nanoestruturado liofilizado:

a. adição de um crioprotetor mediante agitação em temperatura ambiente entre por 30 a 90 minutos;
b. congelamento à temperatura entre -15 a -25°C, por 12 a 36 horas;
c. secagem entre -40 e -60°C, por 24 a 48 horas.

9. USO das composições reivindicadas em 1, 2 e 3, **caracterizado por** ser para preparar um produto para tratamento tópico de dermatofitoses.

FIGURAS

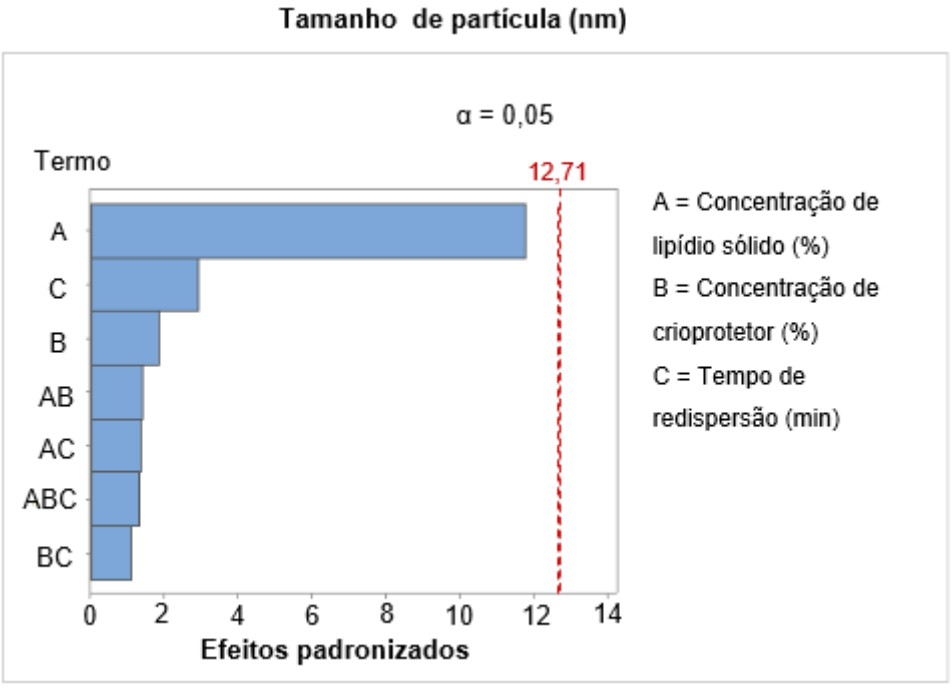


Figura 1A

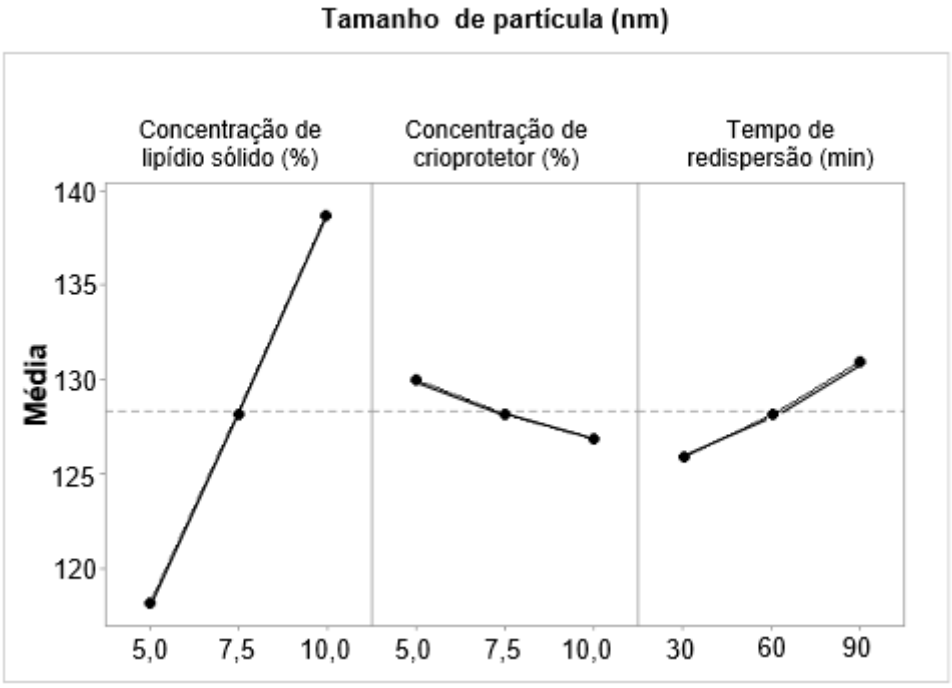


Figura 1B

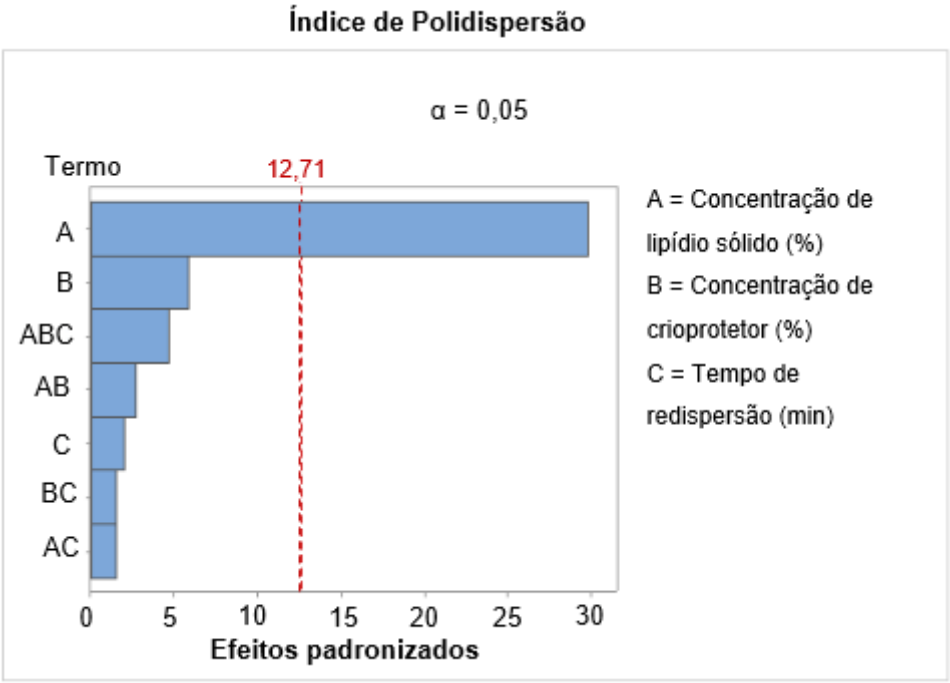


Figura 2A

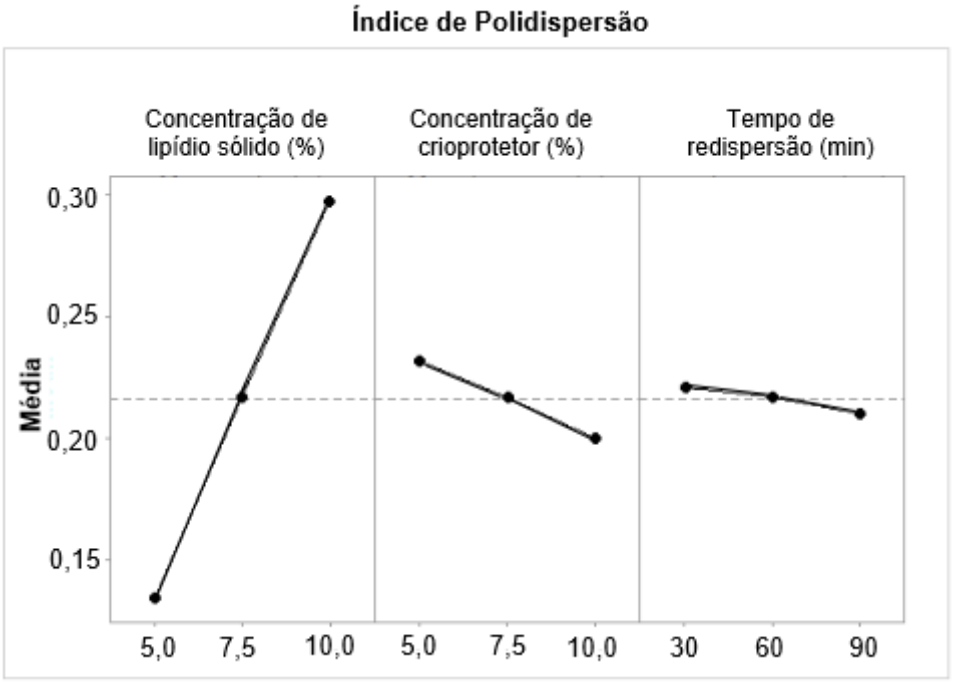


Figura 2B

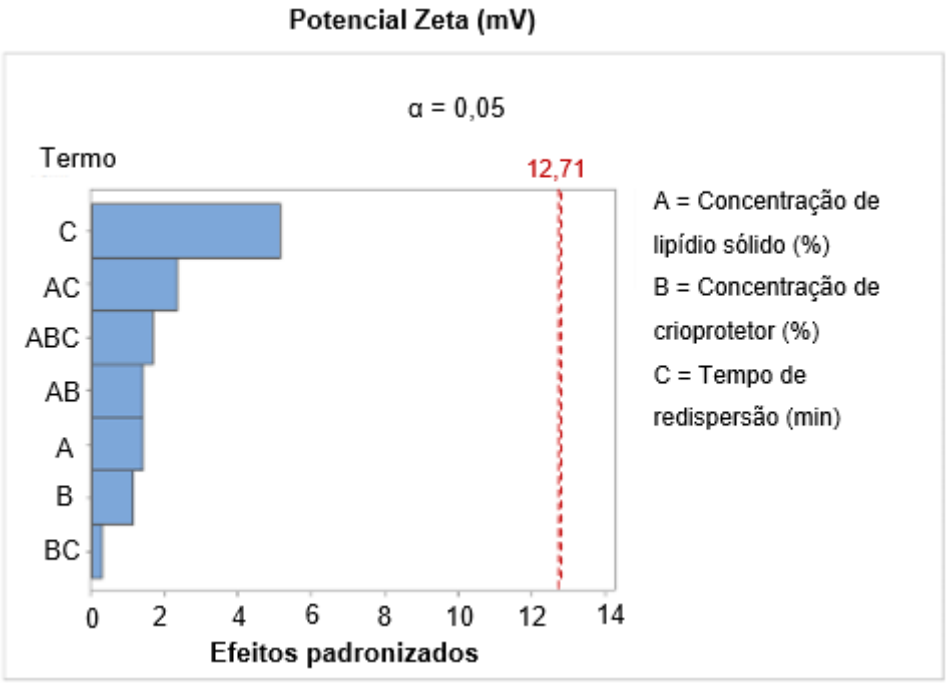


Figura 3A

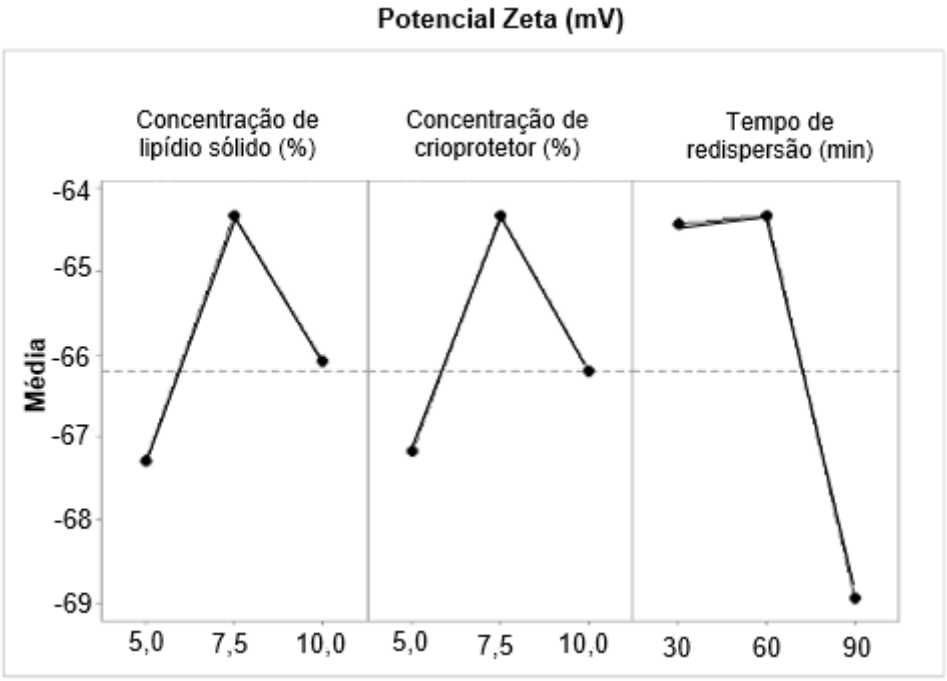


Figura 3B

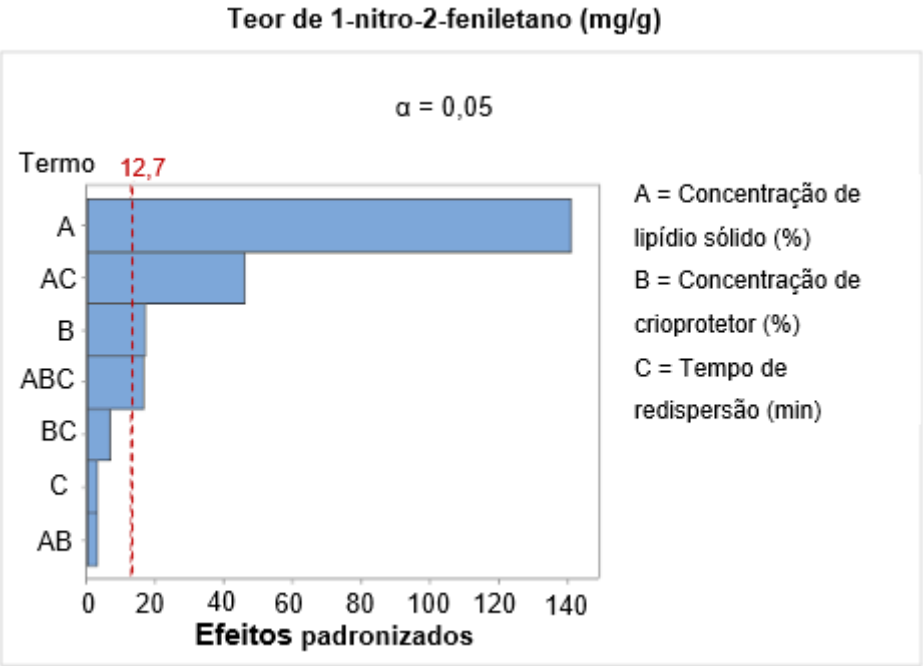


Figura 4A

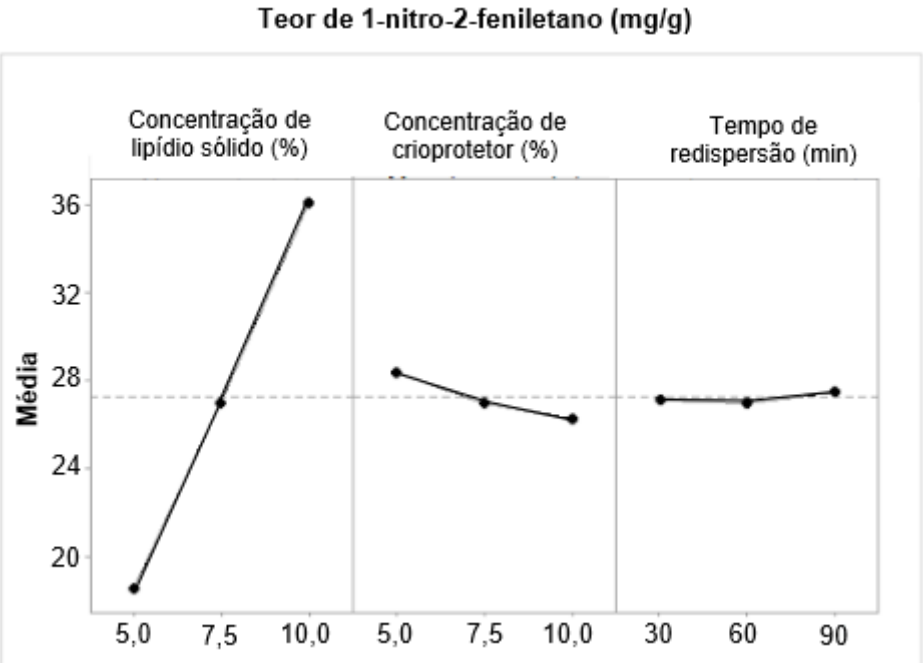


Figura 4B

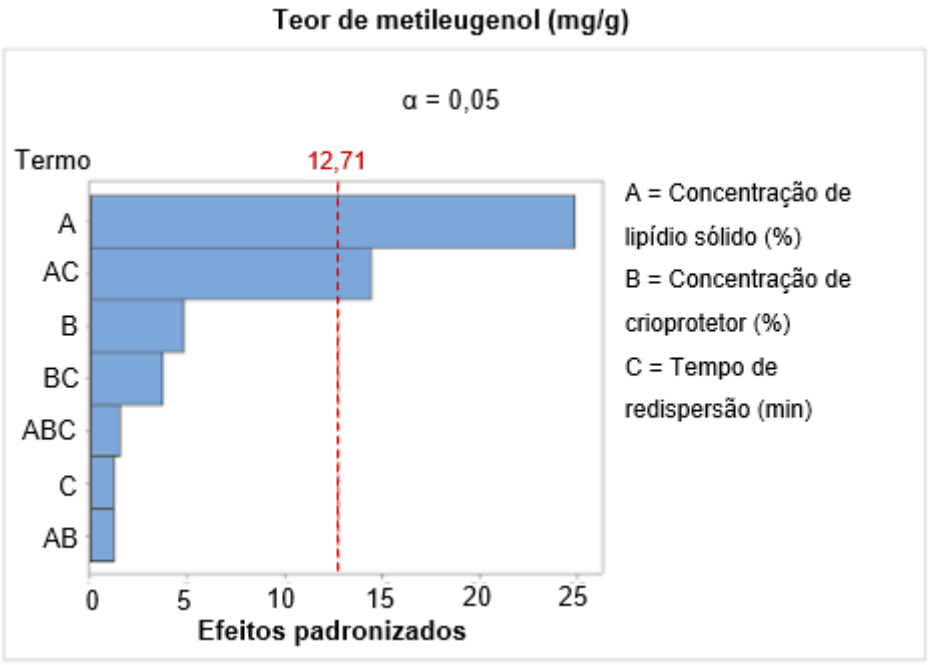


Figura 5A

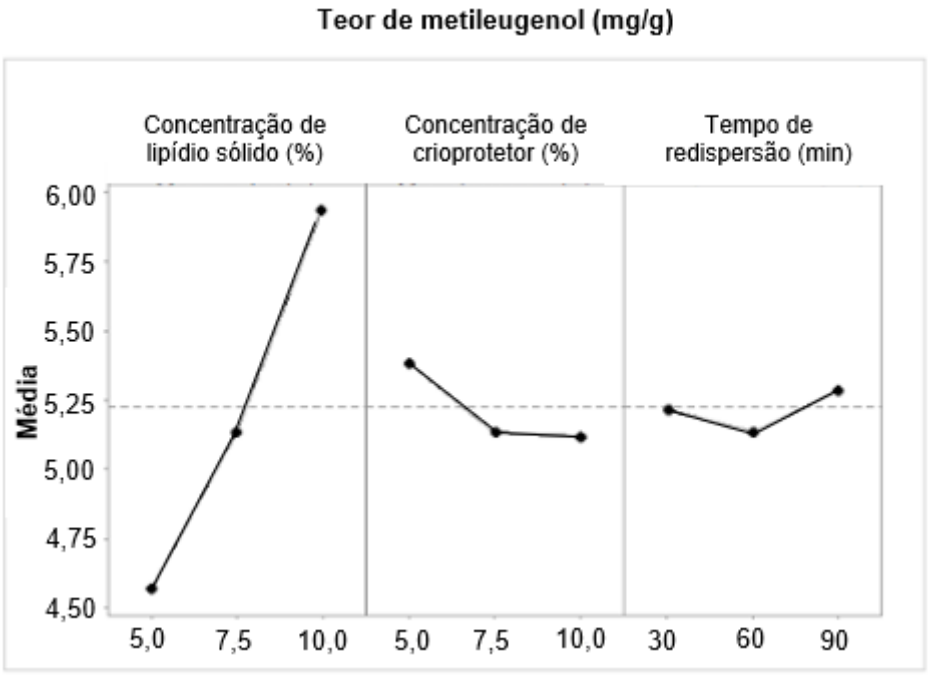


Figura 5B

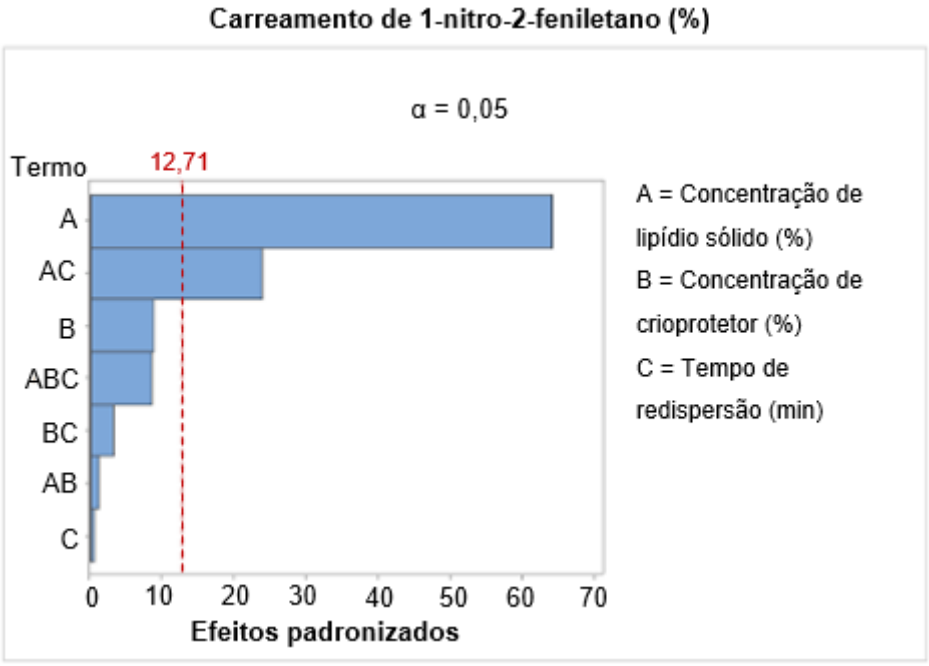


Figura 6A

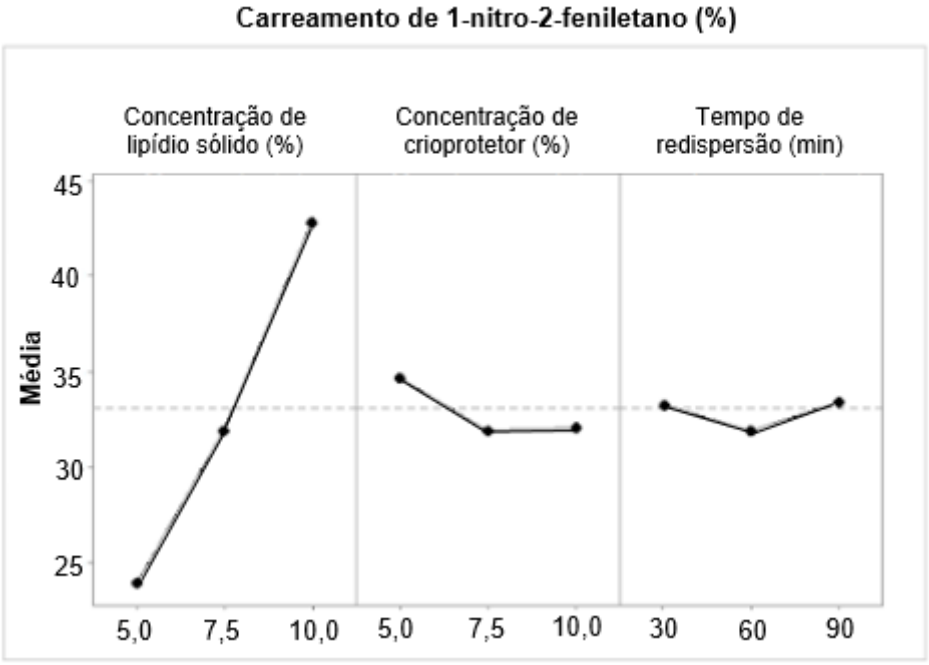


Figura 6B

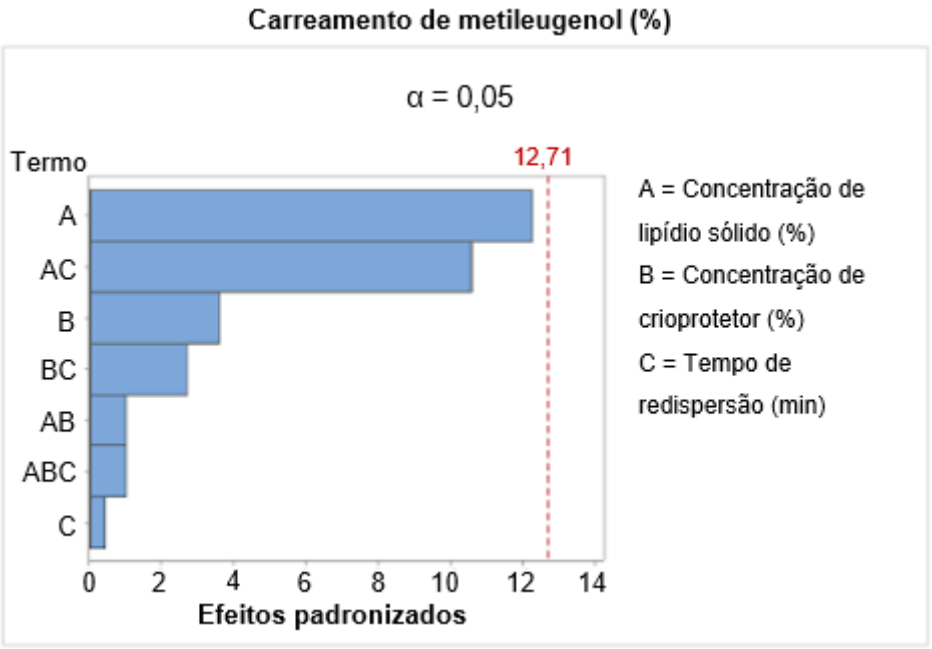


Figura 7A

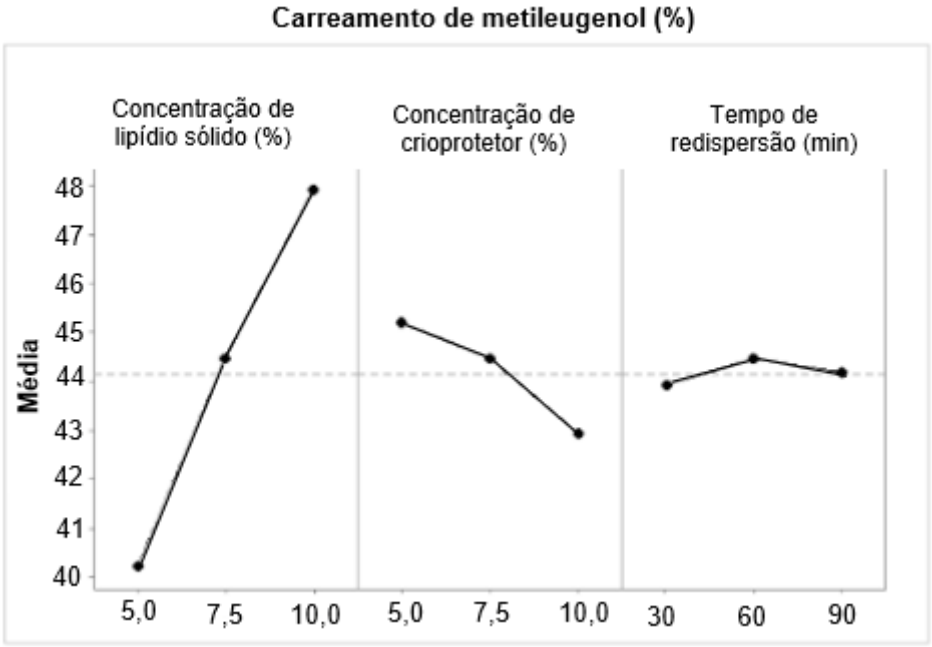


Figura 7B



Óleo essencial *de Aniba canelilla* diluído a 10%

Figura 8A



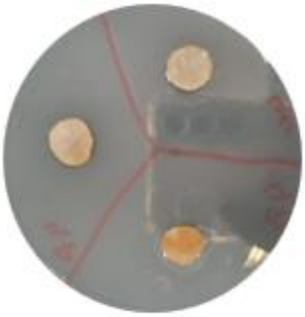
Controle positivo

Figura 8B



Controle negativo

Figura 8C



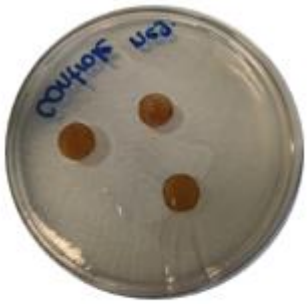
Carreador lipídico nanoestruturado disperso em água

Figura 9A



Controle positivo

Figura 9B



Controle negativo

Figura 9C