

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

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
31 de Julho de 2014 (31.07.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional

WO 2014/113860 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :

A01N 25/00 (2006.01) A01N 25/28 (2006.01)
A01N 25/04 (2006.01) A01N 31/14 (2006.01)

SP (BR). VIEIRA, Paulo Cesar; Rodovia Washington Luiz, Km 235, CEP: 13565-905 São Carlos - SP (BR).

(21) Número do Pedido Internacional :

PCT/BR2014/000044

(74) Mandatário : HESSLING, Marjory Ann; Bhering Advogados, Av. Rio Branco 103, 11 E 12 Andares, CEP: 20040-004 Rio de Janeiro - RJ (BR).

(22) Data do Depósito Internacional :

23 de Janeiro de 2014 (23.01.2014)

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

(25) Língua de Depósito Internacional :

Português

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,

(26) Língua de Publicação :

Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :

BR 102013021210-5
25 de Janeiro de 2013 (25.01.2013) BR



(71) Requerente : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS [BR/BR]; Rodovia Washington Luis, Km 235, CEP: 13565-905 São Carlos - SP (BR).

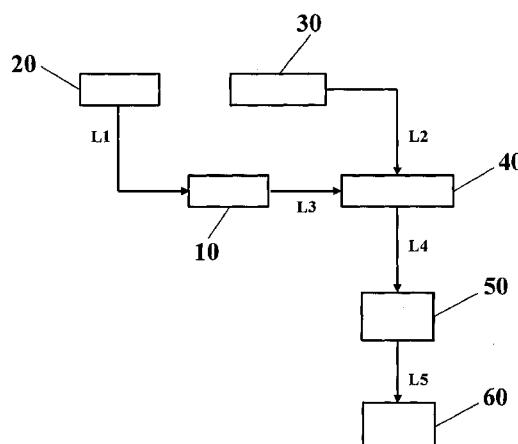
(72) Inventores : FORIM, Moacir Rossi; Rodovia Washington Luiz, Km 235, CEP: 13565-905 São Carlos - SP (BR). FERNANDES DA SILVA, Maria Fátima das Graças; Rodovia Washington Luiz, Km 235, CEP: 13565-905 São Carlos - SP (BR). FERNANDES, João Batista; Rodovia Washington Luiz, Km 235, CEP: 13565-905 São Carlos -

(Continua na página seguinte)

(54) Title : METHOD FOR PRODUCING BIOPOLYMER NANOPARTICLES CONTAINING OIL AND EXTRACTS OF AZADIRACHTA INDICA A. JUSS (NEEM), POWDERED BIOPOLYMER NANOPARTICLES AND MICROPARTICLES

(54) Título : PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO E EXTRATOS DE AZADIRACHTA INDICA A. JUSS (NEEM), NANOPARTÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS E MICROPARTÍCULAS EM PÓ

FIG. 4



(57) Abstract : A method is described for producing biopolymer nanoparticles containing oil and extracts of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem), the method comprising, in phase I, the preparation (10) of an aqueous emulsion of Neem oil and extracts, in phase II, the preparation (20) of a solution of biopolymer in an organic solvent, phases I and II being then mixed, and in phase III, the preparation (30) of an aqueous surfactant emulsion and the admixture of phase III to the mixture of phases I and II, producing a nanoparticle suspension that is stabilised. Also described are the resulting powdered biopolymer nanoparticles and microparticles.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)



SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, **Publicado:**
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

É descrito um processo de obtenção de nanopartículas biopoliméricas contendo óleo e extratos de Azadirachta Indica A. Juss (Neem) que compreende na Fase I, em (10), o preparo de uma emulsão aquosa do óleo e extratos de Neem, na Fase II, em (20), o preparo de uma solução de biopolímero em solvente orgânico, seguido da mistura das duas Fases I e II, e na Fase III, em (30), o preparo de uma emulsão aquosa de um tensoativo e adição da mesma à mistura das Fases I e II, obtendo uma suspensão de nanopartículas que é estabilizada. São também descritas as nanopartículas biopoliméricas e as micropartículas em pó obtidas.

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
BIOPOLIMÉRICAS CONTENDO ÓLEO E EXTRATOS DE
AZADIRACHTA INDICA A. JUSS (NEEM), NANOPARTÍCULAS
BIOPOLIMÉRICAS E MICROPARTÍCULAS EM PÓ**

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo dos processos de preparação de nanopartículas para encapsulamento de extratos e óleos de *Azadirachta indica* (Neem), mais especificamente, a um tal processo para encapsulamento de Neem em matrizes biopoliméricas, em suspensão coloidal e em pó.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Produtos derivados da *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) possuem uma posição de destaque num seletivo grupo de produtos naturais, ambientalmente corretos, disponíveis comercialmente para o controle de insetos e pragas. O Neem é uma planta tolerante às mais adversas condições de cultivo, se expandindo rapidamente ao redor do globo. Relatos na literatura identificam 500 espécies de insetos sensíveis a algum tipo de ação aos extratos de Neem.

Atualmente, as nanopartículas poliméricas constituem uma abordagem mais sofisticada de formulação agroquímica podendo ser aplicadas na busca de novas propriedades para o correto uso de Neem. Entre suas principais vantagens ao setor podem se destacar sua capacidade de controlar a taxa e as condições de liberação dos ingredientes ativos, aumentar a solubilidade, reduzir o contato dos ingredientes ativos com os trabalhadores rurais e vantagens ambientais como a redução das taxas de escorrimento.

Esta tecnologia permite manipular as propriedades do envoltório exterior de uma cápsula, a fim de controlar o momento da liberação da substância ativa.

Vários trabalhos descrevem o uso do Neem na obtenção de nanopartículas metálicas e no preparo de micropartículas em pó formuladas com Neem. Os trabalhos que utilizam o Neem na obtenção de nanopartículas metálicas apenas usam o Neem no processo, contudo, o 5 objetivo é preparar produtos metálicos, totalmente desconexos ao presente processo.

A agricultura normalmente é vista como consistindo de três tipos de sistemas: econômico, social e ecológico (ou meio ambiente). Os três são interligados, e as interações entre a agricultura e o meio ambiente são 10 complexas. Problemas ambientais como a degradação de solos, desertificação, destruição de florestas tropicais e a consequente diminuição da vida selvagem e poluição de mananciais hídricos relacionam-se com práticas agrícolas inadequadas ou com o uso intensivo de insumos.

15 Desde os tempos romanos (1º século A.C.) até a metade do século XX, o controle de insetos era realizado por produtos derivados de plantas como a piretrina, a rotenona e nicotina (bioinseticidas ou inseticidas naturais). A descoberta do DDT (diclorodifeniltriclorometano), inicialmente acreditado como sendo a solução contra os ataques de insetos, após um 20 período prolongado de uso, demonstrou-se desastroso. Isto ocasionou uma busca por compostos sintéticos seguros à base de hidrocarbonetos clorados. Esses compostos, todavia, apenas provaram ser excessivamente tóxicos e ecologicamente desastrosos além de propiciar que os insetos adquirissem resistência a tais produtos.

25 O uso de pesticidas sintéticos vem sendo utilizado há mais de 50 anos, tornando-se a principal ferramenta inseticida. Embora sua utilização tenha sido eficiente no controle de algumas espécies de praga, possibilitando incrementos significativos na produção de alimentos, seu uso extensivo e algumas vezes indiscriminado tem provocado diversos 30 problemas de repercussão social e ambiental, incluindo contaminações do

solo, do ar, da água, dos peixes, animais e do próprio homem, redução da biodiversidade, da população de inimigos naturais, da população e do número de espécies de abelhas e polinizadores, além da resistência das pragas e o surgimento de pragas secundárias.

5 Estima-se que o prejuízo causado pelas pragas na produção mundial de alimentos, apesar dos esforços, ainda seja de pelo menos um terço da produção.

Outro problema a ser destacado são as barreiras fitossanitárias existentes. Elas são de grande importância para a soberania dos países,
10 face à proteção das lavouras e a segurança alimentar da população. As restrições de caráter fitossanitário vêm impondo aos países exportadores de alimentos a necessidade do domínio da tecnologia da produção agrícola e do controle de todas as etapas da cadeia agro-produtiva. O Brasil como um dos grandes produtores de alimentos do mundo tem nos
15 produtos fitossanitários um dos instrumentos imprescindíveis à promoção da defesa vegetal.

Hoje, os inseticidas naturais constituíram-se como uma opção e/ou complemento ao controle pragas, reduzindo ou eliminando o uso de agrotóxicos sintéticos. Estas propriedades fazem dos inseticidas naturais
20 uma importante ferramenta para muitos programas de gerenciamento de pragas. Entretanto, produção significante, regulamentação e problemas de aplicação, armazenamento e reproduzibilidade da eficácia devem ser primeiramente solucionados permitindo que tais produtos possam ser adquiridos com confiabilidade pelo mercado.

25 Entre os principais problemas limitantes ao uso de inseticidas naturais podem se destacar necessidades de identificação e estudo de espécies vegetais que permitam a exploração sustentável, a influência de fatores sazonais e intempéries da natureza, a falta de controle de qualidade e reproduzibilidade da ação inseticida e a carência de

mecanismos de estabilização para o correto uso e manipulação dos compostos ativos.

Diversos fatores podem alterar a estabilidade de um produto ou composto ativo de origem natural. Cada componente, quer ativo ou inativo, dependendo da quantidade pode afetar a estabilidade.

Outros fatores, chamados extrínsecos como temperatura, radiação, luz, ar (especificamente o oxigênio, dióxido de carbono e vapores de água), umidade, local e hora da coleta e de acondicionamento também alteram a estabilidade e o conteúdo de compostos ativos.

Há ainda os fatores intrínsecos como: incompatibilidades, pH, hidrólise, racemização e oxidação. Por exemplo, a rápida degradação dos compostos de *A. indica* a inviabiliza para alguns cultivos, como a fruticultura e para a horticultura (já que o efeito residual é normalmente de 4 a 8 dias apenas). Estudos demonstraram que a atividade da azadiractina pode ser reduzida a quase 60% após 4 horas de exposição ao sol podendo chegar próximo a 50% após 15 horas. Resultados obtidos no campo indicaram que extratos do *A. indica* aplicados sobre as culturas podem permanecer ativos por cerca de três dias apenas.

Na procura por inseticidas naturais, a família Meliaceae foi identificada como um dos grupos mais promissores uma vez que grande parte de suas espécies apresenta múltiplas ações no controle de pragas. Dentro da família Meliaceae, uma espécie em especial se destaca, a *Azadirachta indica* de A. Jussieu, popularmente conhecida por Nim ou Neem.

O Neem, planta nativa de Myanmar e das regiões áridas do subcontinente indiano, presente da Índia à Indonésia tem sido introduzida por toda a região tropical do globo. Atualmente, pode ser encontrada desde os países asiáticos aos africanos, na Austrália, região tropical da América do Norte, América Central e América do Sul.

O Neem é uma planta que tem sido extensamente usada em diversas áreas como na medicina, medicina veterinária, agricultura, farmacêutica, indústria de cosméticos, moveleira, reflorestamento vegetal entre outras. É uma árvore tolerante às mais adversas condições de 5 cultivo (altas temperaturas, solos pobres e salinos, etc.) sendo um dos fatores que justifica sua rápida expansão mundial. Destas propriedades, o grande interesse atual nas pesquisas envolvendo o Neem, principalmente no mundo ocidental, são suas propriedades inseticidas. Atualmente, cerca de 500 espécies de insetos foram relatadas como sensíveis a algum tipo 10 de ação aos extratos de Neem.

As propriedades do Neem se devem a um grande número de metabólitos secundários, principalmente triterpenos e limonóides, disponíveis em diversas partes da planta. Entre esses compostos merece destaque a azadiractina (Figura 1), principal constituinte da planta e de 15 formulações comerciais.

A azadiractina é um limonóide que se concentra principalmente nos frutos, contudo, pode ser encontrado em menores teores em toda a planta.

Essa substância apresenta diversas oxidações biossintéticas 20 formando vários grupos funcionais contendo oxigênio que tende a tornar esse composto mais reativo tanto química quanto biologicamente.

Estudos prévios vêm demonstrando diversos problemas de estabilidade e degradação em compostos ativos de origem natural. Por exemplo, mesmo quando armazenado sob condições ideais, ao abrigo da 25 umidade, luz e temperatura, o conteúdo da azadiractina em óleos comerciais de Neem decai em função do tempo.

A Figura 2 ilustra a curva de decaimento da azadiractina.

Amostras de óleos de Neem submetidas ao processo de envelhecimento acelerado por radiação UV permitem observar a 30 degradação constante da azadiractina. Num sistema fechado, realizado

sob radiação ultravioleta, a velocidade de degradação em amostras de óleo/água foi aproximadamente 108 vezes maior do que aquele observado para amostras de óleo isento de água.

Estes resultados demonstraram a ação degradativa da umidade sobre o produto natural num mecanismo de hidrólise catalisado por radiação ultravioleta. O mecanismo está ilustrado na Equação 1 a seguir.



A presença de grupos funcionais nos metabólitos do Neem como, por exemplo, os grupos epóxido, éter, éster, sistemas conjugados, etc., presentes na molécula da azadiractina são os principais responsáveis por sua baixa persistência ambiental tendo como principal problema sua sensibilidade à fotodegradação. A rápida perda da atividade da azadiractina limita seu uso na agricultura. Um inseticida deve ser persistente o bastante para causar a morte ou controle dos insetos e pragas.

A falta de métodos de monitoramento e controle de qualidade tornou-se outro fator limitante ao desenvolvimento e uso confiável dos produtos naturais. Na ausência de protocolos de produção e métodos de controle de qualidade torna-se impossível garantir a reproduzibilidade da ação esperada para um determinado produto.

Simultaneamente ao desenvolvimento dos biocidas (naturais ou sintéticos) tem havido a necessidade de uma ampla variedade de tipos de formulações, aditivos e processos tecnológicos capacitando a formulação de pesticidas de ingredientes ativos com diferentes propriedades físicas e/ou químicas.

As formulações têm como objetivo promover o uso conveniente e seguro de um produto o qual não será deteriorado num período de tempo e obter a máxima a atividade inerente a um composto ativo.

Formulações mais sofisticadas à base de poderosos surfactantes e outros aditivos e um melhor entendimento dos princípios da química de colóides e de superfície em como aumentar a estabilidade da formulação e sua atividade biológica atende às necessidades do operador, aos 5 requisitos de segurança ambiental e melhora a atividade e persistência dos compostos ativos.

As formulações de ingredientes ativos de pesticidas mais comuns citadas pela GCPF – *Global Crop Protection Federation (CropLife International)* incluem granulados (GR), soluções concentradas (SL), 10 concentrados emulsionáveis (EC), pós molháveis (WP), suspensões concentradas (SC), emulsões Oléo/água (EW), microcápsulas (CS), etc.

Uma abordagem mais sofisticada à formulação de agrotóxicos em escala nanométrica envolve a nano e micro encapsulação. Entre suas principais vantagens ao setor podem se destacar a capacidade de 15 controlar e em que condições o ingrediente ativo é liberado, aumentar a solubilidade, reduzir o contato dos ingredientes ativos com os trabalhadores rurais, prorrogar a validade das patentes e vantagens ambientais como a redução das taxas de escorrimento. Esta tecnologia permite manipular as propriedades do envoltório exterior de uma cápsula, 20 a fim de controlar o momento da liberação da substância ativa.

Um grande número de diferentes estratégias tem sido proposto para modificar as características físico-químicas das nano e micro partículas e, assim, sua interação com o meio biológico. Por exemplo, já é possível modificar a natureza química da matriz polimérica das partículas alterando 25 certas características como bio-recognição, bio-distribuição, bio-adesão, bio-compatibilidade, mobilidade e bio-degradação.

As nanopartículas poliméricas podem ser definidas como partículas poliméricas coloidais contendo compostos ativos. As nanopartículas podem ser classificadas em duas categorias, nanocápsulas e 30 nanoesféricas.

As nanocápsulas são compostos carregadores formados por um núcleo oleoso revestido por uma parede polimérica, podendo o composto ativo estar neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica.

Por outro lado, as nanoesféricas consistem de uma matriz polimérica sólida não apresentando óleo em sua composição, estando os compostos retidos e/ou adsorvidos.

Ambos os colóides são estabilizados por surfactantes na interface partículas/água.

Diferentes processos de produção de nano e micro partículas estão disponíveis e podem desenvolver e/ou melhorar características físico-químicas como tamanho, estrutura, morfologia, textura de superfície e composição. Vide a este respeito as publicações Soppimath, K.S., et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 70, 1 – 20, 2001; Couvreur, P. et al., Nanocapsule technology. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19, 99-134, 2002; Tice, T.R.; Gilley, R.M. Preparation of injectable controlled-release microcapsules by solvent-evaporation process. *J. Control. Release* 2, 343 -352, 1985; Ibrahim, H.; et al., Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int. J. Pharm.* 87:239-246, 1992; Caliceti, P. et al., Effective protein release from PEG/PLA nanoparticles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques. *J. Control Release* 94, 195-205, 2004; Galindo-Rodriguez, S. et al., Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm Res* 21, 1428-1439, 2004.

Os sistemas de liberação coloidal demonstram um grande e eficiente potencial como meio de liberação de um ou de uma mistura de compostos ativos (extratos vegetais) em sites específicos de ação (sistemas de vetorização) e controle sobre a velocidade de liberação, minimizando assim efeitos tóxicos indesejáveis e melhorando suas

estabilidades físico-químicas, vide Tse, G. et al., Thermodynamic prediction of active ingredient loading in polymeric microparticles. *J. Control. Release* 60, 77–100, 1999.

A biodegradação pode ocorrer num sistema biológico através do relaxamento da cadeia polimérica, da quebra da unidade monomérica localizada na extremidade da cadeia (erosão) ou ainda através da cisão aleatória de uma ligação em alguma posição ao longo da cadeia polimérica (degradação).

Os trabalhos descritos na literatura para a espécie *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) relacionados com a nanotecnologia são tão diversificados como vasto é o tema nanotecnologia.

Dentre os trabalhos mais próximos à pesquisa que resultou no presente pedido está o artigo por Riyajan, As-Ad.; Sakdapipanich, J.T. Encapsulated neem extract containing Azadiractin-A within hydrolyzed poly(vinyl acetate) for controlling its release and photodegradation stability. *Chemical Engineering Journal* 152, 591-597, 2009. Os autores utilizaram acetato de polivinila em rede com glutaraldeído 5% (p/v) para o preparo de microcápsulas em pó pela técnica de *Spray-Drying* contendo extratos de Neem. Como resultado foram obtidas micropartículas em pó com diâmetro médio superior a 10 µm, eficiência de encapsulamento de aproximadamente 80% com ganhos na estabilidade (eficiência) contra fotodegradação.

Ainda um outro artigo pertinente é o de Kulkarni, A.R. et al., Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *J. Control. Release* 63, 97–105, 2000. Neste artigo os autores descrevem o encapsulamento de óleo de Neem em partículas formadas por polímeros de alginato de sódio em rede com glutaraldeído. O diâmetro de partícula e eficiência de encapsulamento variaram entre 1,01-1,68 mm e 72-90% respectivamente.

No artigo por Shankar, S.S. et al., *Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth.* *J. Colloid Interface Sci.* 275, 496–502, 2004 é descrito um método de síntese extracelular, ambientalmente correto, para a produção 5 de nanopartículas metálicas de prata e ouro utilizando folhas de *Azadirachta indica*.

Tripathy, A. et al., *Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Azadirachta indica (Neem) leaves.* *J. Nanopart. Res.* 12, 237–246, 2010 utilizaram extratos aquosos de folhas 10 de *A. indica* para produção de nanopartículas cristalinas de prata em processos biomiméticos.

Nanopartículas de prata também foram produzidas por Prathna, T.C. et al., *Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process.* *Colloids Surf.A:Physicochem.Eng.Aspects*, 2011, 15 doi:10.1016/j.colsurfa.2010.12.047, utilizando extratos de folhas de Neem aplicados em estudos cinéticos.

Medidas eletroanalíticas de adenosina e adenosina-5'-trifostato foram determinadas por Goyal, R.N. et al., *Simultaneous Determination of Adenosine and Adenosine-5'-triphosphate at Nanogold Modified Indium 20 Tin Oxide Electrode by Osteryoung Square-Wave Voltammetry.* *Electroanalysis* 19, 575 – 581, 2007 utilizando nanopartículas de ouro modificadas em sistemas biológicos como extratos de *A. indica*.

Partículas contendo folhas de Neem em pó, alginato de cálcio, caulim e bentonita foram preparadas para controlar a cinética de liberação, toxicidade e propriedades do fungicida Thiram®. Neste trabalho, 25 Singh, B. et al., *Controlled release of thiram from neem-alginate-clay based delivery systems to manage environmental and health hazards.* *Applied Clay Science*, 47, 384-391, 2010 demonstram uma aplicação do Neem no preparo de sistemas de liberação controlada com partículas de

aproximadamente 1 mm e eficiência de encapsulamento para o Thiram® próximo a 100%.

Diversos são os trabalhos com pedidos de patentes para produtos e processos envolvendo o Neem.

5 Os pedidos de patente em andamento no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) são dirigidos para fertilizantes, atividades biológicas (germicida, inseticida, bactericida, fungicida, etc.), técnicas de produção de óleo e extratos de Neem, formulações granulares, repelentes, estudos de estabilidade, desodorização, técnicas analíticas, 10 etc. Todavia, nenhum destes trabalhos tem como foco técnicas para a produção de nano e micro partículas poliméricas aplicadas ao aumento da estabilidade dos constituintes químicos derivados do Neem ou para controlar a cinética de liberação dos mesmos em meio biológico, sendo estes os objetivos do presente pedido.

15 Os pedidos de patente depositados junto ao INPI envolvendo a espécie *Azadirachta indica* incluem os pedidos brasileiros publicados BR0804594-1 A2, BR0804546-1 A2, BR0702226-3 A2, BR0701347-7 A2, BR0502588-5 A2, BR0508296-0 A2, BR0000809-5 A2, BR9307044-6 A2, BR9302976-4 A2, BR9202628-1 A2, BR0502772-1 A2, BR0109913-2 A2, 20 BR0700034-0 A2, BR9305223-5 A2, modelo de utilidade MU8602632-1 U2 e patentes brasileiras BR9302980-2 B1 e BR9302981-0 B1.

O pedido brasileiro publicado BR0702226-3 A2 descreve o preparo de um óleo emulsionável de Neem utilizando taíl extraído de Pinnus como emulsionante.

25 O pedido brasileiro publicado BR0508296-0 A2 descreve uma formulação granular com ação sistêmica quanto distribuída na rizosfera. A formulação contém extratos de Neem, cera de hidrocarboneto, argila e corante. O teor de azadiractina neste trabalho foi monitorado e controlado em função de sua concentração nos extratos. Estas formulações

produziram um efeito estabilizador no armazenamento e um controle sobre a liberação em campo da azadiractina.

Na patente brasileira BR9302980-2 B1 é proposto um método de preparo de extratos de Neem com elevados teores de azadiractina sendo 5 a azadiractina neste extrato, mais estável.

Dentre as muitas e diversificadas técnicas de preparo de extratos, o Modelo de Utilidade MU8602632-1 U2 apresenta uma técnica de extração utilizando moinhos de bola para micronização de sementes de Neem, na presença de solventes orgânicos, obtendo micropartículas de sementes 10 de Neem, de fato, sementes moídas e micronizadas.

O pedido brasileiro publicado BR0109913-2 A2 descreve um pesticida na forma sólida, com sistema de liberação de extratos de Neem, livre de solventes orgânicos e completamente solúvel em água, formulado com sacarídeos (metilcelulose, sucrose) obtendo peletes.

As bases de patentes internacionais também relatam um grande número de trabalhos relacionados ao Neem, como os pedidos norte-americanos U.S. 4.515.785, 4.537.774, 4.556.562, 4.902.713, 4.943.434, 4.946.681, 5.001.146, 5.001.149, 5.047.242, 5.110.591, 5.124.349, 5.229.007, 5.281.618, 5.298.247, 5.298.251, 5.352.672, 5.352.697, 20 5.356.628, 5.368.856, 5.370.873, 5.371.254, 5.372.817, 5.391.779, 5.395.951, 5.397.571, 5.405.612, 5.409.708, 5.411.736, 5.420.318, 5.472.700, 5.501.855, 5.503.837, 5.602.261, 5.626.848, 5.635.193, 5.663.374, 5.679.662, 5.695.763, 5.698.423, 5.730.986, 5.736.145, 25 5.756.773, 5.827.521, 5.856.526, 5.900.493, 6.193.974, 6.294.571, 6.312.738, 6.340.484, 6.545.167, 6.602.823, 6.660.291, 6.703.034, 6.703.347, 6.733.802, 6.734.198, 6.746.988, 6.773.727, 6.811.790, 6.824.787, 6.835.719, 6.849.614, 6.855.351, 6.855.351, 6.875.885, 6.930.076, 6.991.818, 7.083.779, 7.112.553, 7.132.455, 7.182.952, 30 7.186.891, 7.194.964, 7.204.994, 7.250.175, 7.250.396, 7.320.966, 7.345.009, 7.345.080, 7.351.420, 7.361.366, 7.390.480, 7.476.397,

7.514.464, 7.530.196, 7.531.189, 7.534.447, 7.537.777, 7.618.645, 7.622.641, 7.655.597, 7.655.599, 7.674.807, 7.687.533, 7.696.232, 7.722.695, 7.754.655, 7.803.832, 7.803.992, 7.807.679, 7.823.323, 7.867.507, 7.871.645, 7.872.067, 7.887.827 e H1.541.

5 Em linhas gerais, muitos destes processos estão relacionados ao preparo de extratos, extração de azadiractina, ganho de estabilidade, atividades biológicas, fertilizantes, formulação e modificações estruturais.

10 Dentre os pedidos recuperados nas buscas, nenhuma técnica, processo ou componentes de formulação é similar àqueles descritos na metodologia objeto do presente pedido.

15 Na patente U.S. 6.340.484 são descritos peletes de sacarídeos impregnados com extratos de Neem livre de solventes orgânicos e completamente solúveis em água, conferindo estabilidade e controle sobre a cinética de liberação.

20 A patente U.S. 5.856.526 relata a preparação de azadiractina em pó com um teor de pureza próximo a 90% e um concentrado emulsionável contendo cerca de 30% em peso de azadiractina. Segundo este documento de patente, a azadiractina em pó foi preparada por técnicas fitoquímicas clássicas de extração e fracionamento envolvendo etapas de maceração, concentração e separação cromatográfica e o concentrado emulsionável preparado dissolvendo-se a fração rica em azadiractina em solventes orgânicos, contendo ou não emulsificantes e protetores solares.

25 Um trabalho similar é descrito na patente U.S. 5.736.145 para processos de purificação e produção de azadiractina em pó e preparo de uma composição aquosa estável para armazenamento. Para a formulação da emulsão são utilizados uma mistura de álcool e água, ácido oléico, emulsificante, extrato e óleo de Neem e ácido *p*-aminobenzóico como protetor solar.

30 A patente U.S. 6.193.974 descreve o preparo de microemulsões utilizando surfactantes não-iônicos para o preparo da emulsão contendo

também ácido *p*-aminobenzóico com protetor solar. Como resultado é obtida uma composição aquosa estável onde dependendo da quantidade de óleo de Neem e diluições, se encontram diferentes teores de azadiractina.

5 Processos de preparação de extratos e frações ricas em azadiractina e emulsões estáveis para armazenamento também estão descritos nas patentes U.S. 6.811.790, 5.827.521, 5.695.763, H1541, 5.420.318, 5.411.736 e outros.

10 Apesar do grande número de trabalhos publicados descrevendo técnicas para se produzir extratos e frações de Neem e azadiractina em pó, a reproduibilidade da técnica geralmente depende de efeitos sazonais e da qualidade da semente colhida.

15 Diversos são também os trabalhos que buscam propor composições viáveis para estabilizar formulações com óleo e extratos de Neem e azadiractina.

Assim novas alternativas vêm surgindo. A patente U.S. 5.698.423 trata de um procedimento para crescimento de células vegetais e produção de azadiractina e reatores sob condições controláveis.

20 A patente U.S. 6.733.802 descreve uma formulação para preparo de um inseticida natural derivado de Neem. Neste trabalho é relatado o uso de surfactantes derivados de plantas dos gêneros *Saponaria*, *Quillaja*, *Chlorogalum*, ou *Sapindus* e anti-oxidantes como vitamina C, tocoferol e outros derivados dos gêneros *Zingiber* ou *Curcuma*.

25 A patente U.S. 6.703.034 traz uma formulação para preparar microemulsões com óleo de Neem utilizando surfactantes não-iônico como, por exemplo, etoxilatos de alquilfenol.

30 A patente U.S. 6.635.757 apresenta formulações inseticidas em pó formadas por um complexo de extrato de Neem contendo azadiractina com ciclodextrinas secas utilizando um Liofilizador ou *Spray-Drying*, que podem ser dispersas em água. Neste trabalho, foram realizadas diversas

variações na composição de azadiractina, agentes de proteção solar (hidroquinona e ácido anacárdico) e ácido salicílico, tendo como resultado formulações que aumentam o tempo de vida do mecanismo de defesa destes inseticidas em cultivos.

5 A patente U.S. 6.667.277 descreve gomas modificadas quimicamente melhorando a eficácia biológica para uso em diversas formulações inseticidas, herbicidas ou fungicidas, com diversos ingredientes ativos entre eles óleo de Neem, na forma sólida, dispersos em meio aquoso com rápida liberação dos agentes biológicos.

10 Na patente U.S. 5.643.351 se utilizam polímeros fundidos, dispersos em água ou solventes orgânicos, encapsulando ingredientes agrícolas com, por exemplo, produtos de Neem, na forma de filmes poliméricos. Neste trabalho foram utilizados polietileno glicol e co-polímeros de óxido de estireno e óxido de propileno, surfactantes não-iônicos, emulsificantes líquidos, agentes de dispersão e protetores ultravioleta.

15 A patente U.S. 7.538.079 descreve um processo para produzir cápsulas em pó por *Spray-Drying* formuladas com sais inorgânicos e agentes benéficos como óleos essenciais para perfumes, materiais aromaterapêuticos, vitaminas, repelentes para insetos, etc., podendo ter em sua composição detergentes, polímeros, agentes sequestrantes e óleos diversos como, por exemplo, óleo de citronela e óleo de Neem, aplicados em processos terapêuticos ou estimuladores.

20 A patente U.S. 5.009.886 traz um processo para produzir micropartículas ou microfibras dentifrícias formuladas com extratos de ramos ou raízes de Neem.

25 A patente U.S. 7.872.067 apresenta como inovação uma composição polimérica anfifílica aplicada para preparar composições dispersas em meio aquoso de compostos insolúveis em água, aplicados na proteção de cultivos. Entre os diversos inseticidas que podem ser 30 formulados é relacionada a azadiractina.

A patente U.S. 7.871.645 provê um método e composição com resinas de trocas iônicas carregadas com um ou mais compostos ativos. Diversos são os pesticidas e fármacos que podem ser adsorvidos nas resinas entre eles, a azadiractina.

5 Partículas carregadoras de pesticidas diversos com diâmetros entre 500 e 3000 micrometros são apresentadas na patente U.S. 7.867.507. O processo consiste em aplicar uma camada de um líquido contendo solvente, fixador específico para os grupos, bentonita, carboidratos, proteínas, lipídios, polímeros sintéticos sobre o grupo carregador carbaril 10 em pó previamente adsorvido com inseticidas, ou fertilizantes, ou herbicidas ou estimulantes, contendo ou não adjuvantes. Entre os diversos pesticidas relacionados passíveis de serem aplicados com as partículas carregadoras se encontra a azadiractina. Dentre as vantagens os autores destacam a redução dos impactos ambientais.

15 Num trabalho similar a patente U.S. 7.754.655 descreve o preparo de formulações agroquímicas como microcápsulas. A microformulação é constituída por uma fase particulada de dispersão de micropartículas de poliureia e/ou poliuretano com agentes penetrantes e, se apropriado, aditivos, dita fase sendo vertida sobre uma suspensão de um composto 20 ativo agroquímico sólido, aditivos (protetores coloidais e emulsificantes) e água. Dentre os compostos os autores também relacionam a azadiractina.

As patentes U.S. 7.655.599 e U.S. 7.655.597 descrevem formulações agroquímicas à base de emulsificantes e adjuvantes, respectivamente.

25 Na patente U.S. 7.655.599 é descrita uma formulação adequada para diversos compostos como a azadiractina, à base de emulsificantes etileno diamina alcoxilado, que age como estabilizante da emulsão ou inibidor de cristalização, ou ambos. Quando necessário, são incorporados

na formulação promotores de penetração, emulsificantes e δ-butirolactona.

Já a patente U.S. 7.655.597 descreve uma composição pesticida (inseticida ou herbicida) formulada com co-polímeros adjuvantes ou 5 aditivos onde o co-polímero consiste de proporções individuais de grupos maléicos ou itacônicos. Esta formulação promove um ganho de eficiência quando comparada ao composto ativo não formulado podendo ser aplicada para a azadiractina.

Excelente estabilidade em formulação sólida granulada dispersa em 10 água foi conseguida conforme a patente U.S. 6.596.292. A formulação é composta pelo composto ativo, entre eles, azadiractina, dispersante, agente molhante, boro, carregador solúvel em água e esmectita.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De um modo amplo, o presente processo para a obtenção de 15 nanopartículas biopoliméricas contendo óleo enriquecido com extratos de *Azadirachta indica* (A. Juss.) (Neem) compreende as etapas de:

a) a partir de amêndoas de Neem, prover óleo de Neem enriquecido com extratos de Neem;

b) Fase I, de formação de uma nanoemulsão óleo/água obtida sob 20 vigorosa agitação por entre dois e sete minutos do óleo e extratos de Neem, constituintes internos, contendo ou não um tensoativo não iônico no meio de dispersão aquosa;

c) Fase II, em que uma solução de acetona ou acetona/etanol 25 contendo um biopolímero previamente dissolvido é vertida lentamente com o auxílio de uma bomba peristáltica sobre a nanoemulsão da etapa a) sob agitação, obtendo uma combinação (Fase I + Fase II);

d) Fase III, em que após um período de 10 minutos de estabilização é adicionada sobre a combinação (Fase I + Fase II), sob agitação, uma terceira fase aquosa contendo um tensoativo de elevado equilíbrio

hidrofílico-lipofílico para garantir a estabilidade da dispersão coloidal obtida;

5 e) agitar moderadamente por um período de 10 minutos e mais 30 minutos em repouso;

f) ajustar o volume final da dispersão coloidal retirando o solvente orgânico e parte da água sob vácuo; e

g) recuperar as nanopartículas biopoliméricas contendo extratos de óleo de *Azadiractha indica* (A. Juss.) em dispersão coloidal.

Assim, a presente provê um processo de obtenção de
10 nanopartículas biopoliméricas contendo óleo, alternativamente óleo enriquecido com extratos de *Azadiractha indica* (A. Juss) (Neem) a partir de um extrato de Neem e preparação de um óleo enriquecido em quantidade de azadiractina, controle da quantidade de azadiractina na matéria prima e nos produtos formulados e formulação de nanopartículas
15 biopoliméricas com extratos e óleo de Neem em suspensão coloidal.

A invenção provê também um processo de preparação de nanopartículas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem que recupera com sucesso a azadiractina, sem demonstrar etapas de degradação enquanto mostra alta eficiência de encapsulamento, necessária para
20 aumentar a estabilidade ultravioleta e capacidade de dispersão em meio aquoso.

A invenção provê ainda um processo de preparação de nanopartículas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem que é de fácil aplicação e de baixo custo.

25 A invenção provê ainda um processo de preparação de nanopartículas poliméricas com óleo e extratos de Neem que permite a formação de nanocápsulas biopoliméricas, isto é, cápsulas em escala nanométrica.

A invenção provê ainda um processo de preparação de nanocápsulas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem que emprega quantidades reduzidas de tensoativos.

A invenção provê ainda um processo de preparação de nanopartículas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem que dispensa o uso de protetores solares sintéticos.

A invenção provê ainda um processo de preparação de nanopartículas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem que proporciona o controle analítico sobre o conteúdo de compostos ativos.

10 A invenção provê ainda um processo de preparação de nanopartículas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem à base de polímeros biodegradáveis comerciais de baixo custo que dispensam a necessidade de etapas de derivatização, com impactos comerciais e ambientais.

15 A invenção provê ainda um processo de preparação de nanopartículas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem onde o pequeno diâmetro das nanopartículas produzidas permite maior penetrabilidade celular, ingestão por insetos, ação sistêmica vegetal, entre outros, com impacto positivo sobre a eficiência biológica.

20 A invenção provê também suspensões coloidais de óleo e extratos de Neem com biopolímeros e opcionalmente tensoativos.

A invenção provê ainda as nanopartículas biopoliméricas com óleo e extratos de Neem para uso agrícola.

A invenção provê adicionalmente micropartículas em pó.

25 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1 anexa mostra a estrutura química do limonóide azadiractina.

A FIGURA 2 anexa é um gráfico que mostra a curva de degradação de azadiractina em óleos de *A. indica*.

A FIGURA 3 anexa mostra Cromatogramas de nanopartículas em suspensão coloidal: isento (Figura 3A) e com extratos de Neem (Figura 3B).

A FIGURA 4 anexa mostra um fluxograma simplificado do processo
5 da invenção.

A FIGURA 5 anexa é um gráfico que mostra a variação de pH da formulação de nanocápsulas de Neem no período entre 0 e 90 dias de armazenamento a temperatura ambiente.

A FIGURA 6 anexa é um gráfico de barras que mostra a
10 investigação do diâmetro de partícula em formulações com diferentes quantidades e tipos de polímeros.

A FIGURA 7 anexa mostra fotomicroscopias de nanopartículas de PCL carregadas com 2% (m/v) de óleo de Neem. Ampliações: a) 10.000 X; b) 25.000 X e c) 50.000 X.

A FIGURA 8 anexa mostra fotomicroscopias de micropartículas em pó de nanocápsulas de Neem. Ampliações: a) 1.000 X; b) 10.000 X e c)
15 50.000 X.

A FIGURA 9 anexa mostra curvas de TG (Figura 9A) e DTG (Figura 9B) obtidas para diferentes formulações de nanopartículas de Neem
20 sendo: A) NC-30 (PCL, oleato de isodecila); B) NC-32 (PCL, óleo de Neem); C) NC-34 (PCL, óleo e extrato de Neem); D) NC-36 (extrato e óleo de Neem) e E) NC-37 (extrato de Neem, oleato de isodecila).

A FIGURA 10 anexa mostra as curvas de recuperação da azadiractina após radiação ultravioleta de: A) Nanocápsulas em pó sem Span[®]60; B) Nanocápsulas em pó com Span[®]60; C) Nanopartículas em suspensão coloidal sem Span[®]60; D) Nanopartículas em suspensão coloidal com Span[®]60; E) Óleo de Neem e F) Óleo de Neem protegido da radiação UV para um conteúdo inicial de Azadiractina de 2.800,0 mg Kg⁻¹.

A FIGURA 11 anexa mostra em gráfico o perfil da liberação acumulada de azadiractina de nanopartículas de PCL em suspensão coloidal ($n = 3$).

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O processo da invenção para preparação de nanopartículas biopoliméricas contendo extratos e óleo de *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) envolve o preparo desses óleos e extratos, biopolímeros para encapsular os ditos óleos e extratos, e opcionalmente tensoativos para o preparo de uma emulsão oleosa.

Portanto um primeiro objeto da invenção é um processo de preparação de nanopartículas biopoliméricas contendo óleo e extratos de *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem).

Um segundo objeto da invenção são as suspensões coloidais resultantes do presente processo.

Um terceiro objeto da invenção são as nanopartículas contendo óleo e extratos de *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) obtidas por evaporação do solvente e de parte da água da dita suspensão coloidal.

Um quarto objeto da invenção são as micropartículas em pó resultantes da evaporação em Spray-dryer das nanopartículas em suspensão coloidal combinadas com uma proporção de suporte de secagem, incluindo sílica coloidal, sem estar limitado a esta.

Úteis para a prática da presente invenção são polímeros não poluentes e não tóxicos na formação das suspensões coloidais, como os polímeros biodegradáveis (biopolímeros) e biocompatíveis, selecionados dentre gelatina, quitosana, alginato de sódio, ciclodextrinas, e os poliésteres alifáticos. Dentre estes compostos, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e os polihidroxialcanoatos, conhecidos como PHA, celulose, fécula de mandioca, e similares.

Estes polímeros podem ser degradados por ação enzimática ou hidrolisados demonstrando aplicações agrícolas e farmacêuticas. Os polímeros biodegradáveis colaboram com ações ambientais, pois são de compostos em campo sem deixarem resíduos.

5 Adicionalmente, o polimetilmetacrilato, (PMMA), utilizado na industria farmacêutica por suas propriedades de biocompatibilidade, pode ser aplicado a seres vivos, embora não seja biodegradável e portanto é um polímero útil para as finalidades da invenção.

10 Os tensoativos úteis para a prática da invenção incluem tensoativos que promovam um rápido equilíbrio hidrofílico-lipofílico, como o monoestearato de sorbitano (span®60) e polisorbato (tween®80).

15 A atividade biológica depende diretamente das características qualitativas e quantitativas dos extratos vegetais, sendo que estas podem ser controladas empregando técnicas como, por exemplo, de enriquecimento de extratos.

Neste caso, a tarefa inicial é assegurar a reprodutibilidade da formulação.

Portanto, a primeira etapa para preparo das nanopartículas compreende preparar e analisar os extratos e óleos de Neem utilizados no processo, o principal parâmetro considerado sendo o teor final de azadiractina.

A matéria prima utilizada para a produção das nanopartículas biopoliméricas compreende principalmente amêndoas de Neem, embora outras partes da planta sejam igualmente úteis.

25 O procedimento de extração utilizado no presente processo envolve a maceração de amêndoas de Neem com *n*-hexano seguido pela extração com etanol.

Conforme esta técnica, o óleo é inicialmente removido das amêndoas pela difusão do solvente (*n*-hexano) através das paredes celulares, sendo dissolvido imediatamente após o contato.

A velocidade de difusão é diretamente proporcional a uma potência do diâmetro das partículas em maceração com circulação livre do solvente, daí a importância da moagem das amêndoas. O diâmetro médio de partículas das amêndoas submetidas à extração está na faixa entre 10 5 e 30 µm. O uso de agitador mecânico de haste no processo de percolação auxilia a micronizar as amêndoas em dimensões menores que aquelas obtidas na moagem em moinho, favorecendo o processo de difusão.

O processo de extração com *n*-hexano produz o óleo de Neem e uma torta, sólida, como subproduto.

10 Uma vez que todo o óleo tenha sido removido, se inicia uma segunda etapa de extração com etanol.

A extração exaustiva de azadiractina é conduzida macerando em etanol o produto sólido (torta) obtido após a percolação com *n*-hexano. O etanol é facilmente difundido entre as paredes celulares, apresenta uma 15 grande afinidade com limonóides, tem baixo custo e facilidade de transposição à escala industrial. Além disso, é considerado um solvente moderno de mistura, de natureza volátil, bastante inerte aos solutos e não irritante à pele humana.

A remoção inicial com *n*-hexano de compostos apolares auxilia a 20 interação soluto/solvente (azadiractina/etanol) na etapa de extração da torta com etanol. Além disso, proporciona a obtenção de extratos sólidos, facilmente manipulados e com maiores conteúdos na razão teor de princípio ativo/quantidade de extrato. Estas características são 25 importantes para as etapas de formulação dos óleos enriquecidos e das nanopartículas.

O rendimento do processo (% m/m), a eficiência de extração (%) e a quantidade total de extrato obtido (g) para os extratos preparados se encontram detalhados na Tabela 1 a seguir.

O conteúdo de azadiractina nos extratos e óleo de Neem é 30 quantificado por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) após

validação analítica, sendo as amostras preparadas conforme o pedido publicado brasileiro BR0700034-0A, do mesmo autor do presente pedido.

A análise inicial da amêndoas de Neem quantificou o teor de azadiractina em $2.912,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de amêndoas, possibilitando calcular o rendimento do processo.

TABELA 1

Quantidade de Amêndoas	Quant. óleo %(m/m)	Quant. extrato (% m/m)	Teor Azad. (mg.Kg ⁻¹ ext.)	Eficiência Extrato (%)	Teor Azad. (mg.Kg ⁻¹ óleo)	Eficiência óleo (%)
1.040 g	505,6 g 48,6	21,4 g 2,06	56.471,0	39,9	419,1	7,0
1.119 g	495,0 g 44,2	19,1 g 1,71	61.698,0	36,2	322,5	4,9
1.105 g	519,3 g 47,0	19,8 g 1,79	58.100,0	35,8	344,9	5,6

O coeficiente de variação entre as análises cromatográficas (triplicatas) foi inferior a 6%; Teor de azadiractina nas amêndoas igual a $2.912,2 \text{ mg Kg}^{-1}$.

Conteúdo de azadiractina obtida no método de extração considerado padrão.

A validação do método analítico foi realizada de acordo com critérios propostos pela ICH (International Conference on Harmonization). As figuras de mérito investigadas na validação do método foram linearidade, seletividade, exatidão, precisão, robustez, recuperação, limites de quantificação e de detecção e repetibilidade.

A seletividade do método analítico foi avaliada comparando cromatogramas de análises de nanopartículas preparadas com extratos e óleos de Neem conforme a Figura 3B e nanopartículas isentas desses extratos e óleos, Figura 3A. Nenhum pico interferente foi observado em 8,68 min no cromatograma do branco (tempo de retenção da azadiractina) no comprimento de onda de trabalho de 217 nm.

Assim, o presente método analítico pode ser considerado seletivo podendo distinguir a resposta do analito de interesse dos demais componentes da mistura.

A linearidade do método analítico proposto para quantificação da azadiractina por CLAE é confirmada por uma curva de calibração construída com as soluções padrões de azadiractina ($n = 7$), obtendo o coeficiente de correlação (r^2) pelo método dos mínimos múltiplos quadrados $r^2 = 0,9999$.

Adicionalmente, o fator de resposta versus a concentração de azadiractina nas amostras padrão ($n = 7$) revela inclinação de (0,045) próximo a zero e um Desvio Padrão Relativo de 2,98% demonstrando a linearidade da faixa de trabalho.

A exatidão [Exatidão = (medida da concentração/concentração nominal) $\times 100$, $n = 15$] pode ser avaliada calculando a porcentagem de recuperação da azadiractina. Verificou-se forte concordância entre os dados experimentais e os valores nominais teóricos.

A análise da precisão [Exatidão = (medida da concentração/concentração nominal) $\times 100$, $n = 15$] possibilitou identificar a extensão de erros aleatórios durante o preparo de amostras e validação do método. Os resultados obtidos indicam uma boa precisão para o método analítico. O Limite de Quantificação do método foi estabelecido em $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o Limite de Detecção foi $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os mesmos procedimentos de validação da azadiractina foram realizados para o 3-tigloilazadirachtol. Os resultados da validação do 3-tigloilazadirachtol foram semelhantes aos descritos para a azadiractina.

Repetibilidade, robustez, recuperação e estabilidade de armazenamento

A repetibilidade foi investigada analisando dez vezes uma mesma amostra de azadiractina nanoencapsulada. Este resultado demonstrou a correlação entre sucessivas análises sobre os mesmos parâmetros cromatográficos e equipamento. O DPR% (Desvio Padrão Relativo) calculado foi de 0,71% ($n = 10$).

A robustez do método analítico foi determinada analisando uma mesma amostra de azadiractina ($95.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em suspensão coloidal de nanopartículas poliméricas de PCL sob pequenas modificações nas condições cromatográficas. Esta avaliação teve como propósito provar 5 que pequenas variações no método são negligenciáveis nos processos de avaliação sendo estudados por mudanças deliberadas em parâmetros críticos monitorando possíveis alterações.

Os resultados indicam que não houve perda da seletividade na separação cromatográfica e na informação quantitativa. A pequena 10 variação no tempo de retenção pode ser justificada por mudanças na interação soluto/solvente/adsorvente. Nenhuma outra variação foi observada demonstrando ser o método robusto a pequenas variações nos parâmetros cromatográficos.

A recuperação do método foi determinada pela comparação de 15 resultados do conteúdo total de azadiractina adicionado e quantificado em suspensões coloidais preparadas com diferentes biopolímeros (PCL, PHB, PMMA).

Os resultados de recuperação foram obtidos pela razão entre o conteúdo de azadiractina quantificado e sua concentração nominal 20 expresso em porcentagem. O valor médio calculado das três diferentes formulações ($95,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi $99,5 \pm 7,1\%$ ($n = 9$) mostrando que não houve perda do analito durante as etapas de preparação das nanopartículas, pré-tratamento ou análises cromatográficas.

Soluções de azadiractina armazenadas a 4°C foram consideradas 25 estáveis.

Preparação das amostras

O pré-tratamento possivelmente é a etapa mais importante em análises quantitativas. Esta é a etapa crítica em análises cromatográficas, usualmente sendo a etapa lenta e com maiores possibilidades de perdas

analíticas no processo. Esta etapa envolve a extração de compostos ativos e a remoção de interferente.

Deste modo foi necessário desenvolver métodos de abertura e pré-tratamento das amostras sem comprometer a recuperação. Assim, para a 5 análise da quantidade total de azadiractina em nanopartículas biopoliméricas em suspensão coloidal foi proposta uma técnica para dissolução do polímero em acetona com posterior separação do polímero e o sobrenadante.

O solvente ideal deve ao mesmo tempo dissolver o polímero e 10 solubilizar a azadiractina sem que haja equilíbrio. Após solubilização, separa-se o polímero do sobrenadante por centrifugação.

O processo de secar as amostras e solubilizar em metanol antes de serem analisadas por CLAE evita que resíduos de polímero comprometam a eficiência de separação e perda prematura da coluna analítica uma vez 15 que estes resíduos não são solúveis em metanol.

O preparo da amostra para análise da eficiência de encapsulamento é mais simples, uma vez que não há necessidade da remoção do polímero ou abertura da amostra.

No entanto foi necessário desenvolver um protocolo para a 20 separação das nanopartículas do meio de dispersão. Uma vez separado o meio e as nanopartículas, é possível quantificar toda a azadiractina dissolvida neste meio.

As amostras em meio aquoso foram secas e re-suspendidas em metanol para manter constante o coeficiente de absorvidade molar da 25 azadiractina em comparação com as soluções padrões usadas na construção da curva de calibração.

Por último, também foi necessário desenvolver um método para análises do conteúdo de azadiractina em micropartículas em pó.

Similarmente à recuperação, foi preciso dissolver o polímero num 30 solvente apropriado (acetona) dispersando a azadiractina previamente

encapsulada. Uma vez dissolvido, separou-se o polímero e o suporte de secagem do sobrenadante por centrifugação. Parte do sobrenadante foi seco e re-suspendido em metanol para análises cromatográficas.

A extração e pré-tratamento das amostras de sementes e óleos de Neem foram realizados conforme método proposto por Forim, M.R.; et al. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. *Anal. Methods* 2, 860–869, 2010. Esses métodos estão descritos detalhadamente a seguir no presente relatório.

10 Preparação de Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas de Neem em suspensão coloidal e em pó foram produzidas com sucesso.

Produtos agroquímicos são convencionalmente aplicados em campo por pulverização, sendo a água utilizada como veículo. Todavia, apenas uma pequena parte dos produtos agroquímicos realmente atinge o alvo esperado, não raramente, numa concentração menor que a concentração mínima efetiva requerida devido a problemas como lixiviação, fotodegradação, hidrólises e degradação microbiana. Conseqüentemente, repetidas aplicações se tornam necessárias causando impactos ambientais diretos ao solo e à água.

Nanopartículas para uso agrícola devem ser projetadas de modo que satisfaçam propriedades físicas e químicas que tenham como resultado uma melhora no controle de pragas agrícolas e redução de riscos ambientais. Dentre os benefícios se pode destacar o ajuste na capacidade de dispersão em meio aquoso de compostos orgânicos com redução do uso de surfactantes, aumento na estabilidade contra degradações provocadas por fotólise, termólise ou hidrólise e controle na liberação de compostos ativos melhorando a atividade biológica desejada. Consequentemente, com o ganho de estabilidade e ajuste da atividade

biológica há uma redução nas dosagens e na necessidade de reaplicações havendo um impacto direto positivo sobre o meio ambiente.

Moinard-Chécot, D.; et al. Mechanism of nanocapsules formation by emulsion-diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science* 317, 5 458-468, 2008 descrevem um mecanismo de nanoencapsulamento por um processo nomeado de emulsão-difusão o qual foi utilizado como referência. Conforme este processo, uma emulsão de óleo, polímero e acetato de etila é inicialmente preparada. Diluição com água pura permite que o acetato de etila seja difundido para fora das gotículas, deixando 10 uma suspensão de nanocápsulas no final. Foi demonstrado que o tamanho das nanocápsulas tem relação com a composição química da fase orgânica e o tamanho da emulsão primária através de uma relação geométrica simples. Como resultado, a maior parte das propriedades das nanocápsulas é determinada na etapa de emulsificação. A difusão do 15 solvente orgânico por etapas ocorre por equilíbrios de partição sucessivos do acetato de etila entre as gotículas e a fase aquosa.

Já o presente processo para o preparo de nanocápsulas de Neem compreende o preparo de três diferentes fases: a) emulsão em fase 20 aquosa, b) fase orgânica com um polímero de encapsulamento e c) fase aquosa com um tensoativo.

Como resultado, há inicialmente a incorporação das moléculas que se deseja nanoencapsular numa nanoemulsão, seguido pelo recobrimento polimérico, formando nanopartículas e, por ultimo, a estabilização da suspensão coloidal com um tensoativo.

Nos métodos previamente descritos o processo de formação e incorporação vesicular das moléculas que se deseja nanoencapsular, revestimento polimérico e estabilização ocorrem em uma única etapa.

Inicialmente, os extratos de Neem são utilizados para enriquecer o óleo controlando o teor de azadiractina presente na formulação e no 30 produto final.

Embora o modo preferido da invenção contemple o uso de óleo combinado a extratos de Neem, o conceito da invenção prevê alternativamente uma formulação contendo unicamente o óleo de azadiractina, sem a adição de extratos para enriquecer o mesmo.

5 No caso do uso de extrato para enriquecer o óleo, a quantidade necessária é determinada após análises cromatográficas do conteúdo de azadiractina. Por exemplo, um óleo com um teor de azadiractina de 419,1 mg Kg⁻¹ pode ser enriquecido com 28,0 g de um extrato de 56.471,0 mg Kg⁻¹ a um conteúdo final de 2.000 mg Kg⁻¹. (Quantidade necessária de 10 azadiractina para 2.000 mg em 1Kg de óleo = 2.000 – 419,1 = 1.581 mg; extrato g = 1.581 x 1000 g / 56.471 mg = 28,0 g a ser incorporado em 1 Kg de óleo).

Assim, o uso de diferentes quantidades de extratos ou extratos com 15 diferentes conteúdos de óleo de azadiractina permite obter suspensões coloidais e produtos em pó, com diferentes teores de azadiractina, ou seja, produtos com 1.000, 2.000, 10.000 mg Kg⁻¹ de azadiractina.

Conforme o esquema da Figura 4, na seqüência, o óleo enriquecido com extratos de Neem é disperso em (10) sob vigorosa agitação em fase aquosa (Fase I) durante dois a sete minutos, tipicamente cinco minutos. 20 Este sistema possibilita a formação de micelas com o óleo de Neem criando uma emulsão. Em função da diferença de solubilidade entre a fase aquosa e as micelas, os constituintes do extrato de Neem permanecem na fase micelar, não sendo dispersos para a fase aquosa.

Na Fase I o uso de tensoativos como o tensoativo não iônico 25 monoestearato de sorbitano Span®60 é opcional, melhorando as características ambientais da formulação. A exclusão possível deste tensoativo já apresenta uma melhoria sobre o método de nanoprecipitação. O não uso do tensoativo reduz o custo de produção e possíveis impactos ao meio ambiente.

Na Fase I o teor de óleo varia entre 0,5 e 10% (m/v), o teor de extrato entre 0,1 e 5% (m/v) e o teor de tensoativo entre 0,1 e 2% (m/v).

Uma típica formulação é a seguinte:

Fase I: [Óleo] = 2% (m/v), [extrato] = 0,5% (m/v) e [Span[®]60] 0,5% (m/v) em meio aquoso (200 mL).

Uma segunda fase (Fase II) é preparada em (20) dissolvendo um biopolímero em solvente orgânico miscível em água selecionado dentre acetona ou uma mistura de acetona e etanol em qualquer proporção.

A dissolução do biopolímero ocorre sob aquecimento de 40-50°C, tipicamente 45°C e agitação.

Uma formulação típica para a Fase II é a seguinte: dissolver entre 0,1 e 2g de polímero, tipicamente 1,0 g de polímero, por exemplo, o PCL, em 200 mL de solvente orgânico composto pela mistura de acetona e etanol em proporções de acetona, variando entre 100% (0% de etanol) a 30% (70% de etanol).

Uma vez disperso o polímero na fase orgânica, esta fase é vertida lentamente sobre a emulsão da Fase I via L1. Com a difusão do solvente orgânico na fase aquosa via L3 ocorre a deposição do polímero na interface óleo-água resultando em (40), na mistura da Fase I + Fase II, dando origem às nanopartículas em forma de nanocápsulas.

Por último, uma terceira fase (Fase III) em (30) composta por água e um tensoativo não-iônico é preparada e vertida via L2 sobre as nanocápsulas pré-formadas em (40), podendo agora o tensoativo adsorver sobre as nanopartículas atuando como dispersante.

O tensoativo da Fase III é um tensoativo não iônico e emulsificante, por exemplo, o polisorbato 80, conhecido como Tween[®]80, derivado do polietoxilato de sorbitano e ácido oleico. O polisorbato 80 é viscoso e solúvel em meio líquido.

Uma formulação típica para a Fase III é a seguinte: dispersar entre 0,1 e 2 g de tensoativo, tipicamente 1,0 g do tensoativo, em 100 mL de água destilada.

Finalmente o solvente e parte da água são removidos por evaporação sob pressão reduzida via L4 ajustando o volume final e o conteúdo de azadiractina no meio de dispersão, resultando no produto desejado em (50), uma nanopartícula contendo óleo e extratos de Neem em suspensão coloidal.

A nanopartícula (50) quando submetida a processos de secagem com auxílio de um suporte, selecionado dentre sílica coloidal e suportes similares via L5 permite a obtenção de uma micropartícula em pó (60).

A proporção de nano partícula (50) para o suporte é entre 1:0,2 a 1:2 m/m de nanopartículas para sílica. O tipo e o conteúdo dos componentes das formulações foram variados no decorrer dos experimentos da Requerente que levaram ao presente pedido.

O presente processo contempla ainda uma modalidade em que são produzidas micropartículas em pó diretamente, caso em que a Fase III de preparo da solução aquosa de emulsificante e a adição da mesma via L2 à mistura das Fases I e II são dispensáveis. A suspensão coloidal obtida por mistura da Fase I e Fase II é nesta modalidade diretamente transformada em nanopartículas em (40), tem o volume reduzido para obter as nanopartículas (50) e é transformada em micropartículas em pó (60) por Spray-Drying.

Os extratos podem ser usados para enriquecer ainda mais o conteúdo de azadiractina nas suspensões coloidais.

O uso de Span[®]60 ou outro tensoativo é opcional.

Fase II: [Polímero] = 0,5% (m/v) em fase orgânica (200 mL).

Fase III: [Tween[®]80] = 1,0% (m/v) em meio aquoso (100 mL).

Após o preparo das nanocápsulas e ajuste do volume final do meio aquoso de dispersão (200 mL) a formulação típica final é a seguinte:

Meio de dispersão: [Óleo] = 2 % (m/v), [extrato] = 0,5 % (m/v), [Span[®]60] 0,5 % (m/v), [Polímero] = 0,5 % (m/v) e [Tween[®]80] = 0,5 % (m/v).

A invenção será descrita a seguir em relação a Exemplos 5 específicos, mas não deve ser considerado que os mesmos sejam limitativos da invenção.

Nanopartículas biopoliméricas foram sintetizadas de modo eficiente e reproduzível utilizando o processo da invenção.

Exemplos ilustrativos estão listados abaixo na Tabela 2.

10

EXEMPLOS

TABELA 2

EX.	Fase I				Fase II		Fase III		Vol. final (mL)
	Óleo Neem (g)	Extrato Neem (g)	Span [®] 60 (g)	Água (mL)	Solvente (mL)	PCL (g)	Tween [®] 80 (g)	Água (mL)	
1	4,0	1,0	-o-	200,0	200,0	1,0	1,0	100,0	200,0
2	4,0	1,0	1,0	200,0	200,0	1,0	1,0	100,0	200,0
3	2,0	1,0	-o-	200,0	200,0	1,0	1,0	100,0	200,0
4	2,0	1,0	1,0	200,0	200,0	1,0	1,0	100,0	200,0
5	-o-	-o-	-o-	200,0	200,0	1,0	1,0	100,0	200,0
6	-o-	-o-	1,0	200,0	200,0	1,0	1,0	100,0	200,0

15

As medidas de pH, diâmetro de partículas (diâmetro hidrodinâmico), polidispersão e potencial zeta são parâmetros indicativos da estabilidade da suspensão coloidal.

O valor do pH dos sistemas coloidais pode afetar a estabilidade de sistemas coloidais, pois alterações neste parâmetro podem estar relacionadas com a degradação do polímero, de algum outro componente da formulação, ou mesmo na difusão da substância ativa da partícula para o meio. Alterações no pH também podem afetar a velocidade de liberação do composto ativo ou catalisar reações de degradação.

O diâmetro de partícula e o tamanho de sua distribuição podem afetar a estabilidade coloidal do sistema, cinética de liberação, capacidade de carregamento, distribuição *in vivo* (ação sistêmica) e toxicidade.

A polidispersão, ou índice de polidispersividade - IP, indica a distribuição média do tamanho das nanopartículas e, normalmente, valores menores que 0,2 para a suspensão coloidal são considerados bons indicadores de estabilidade.

5 Por sua vez, o potencial zeta reflete a carga de superfície das nanopartículas sendo este parâmetro influenciado pela composição das partículas, meio dispersante, pH e força iônica da suspensão coloidal. Normalmente, nanopartículas com valores de potencial zeta em módulo \geq 30 mV possuem boa estabilidade coloidal em suspensão.

10 O aumento na quantidade do óleo leva à formação de nanocápsulas com diâmetro de partícula ligeiramente superior. Para esta matriz, observou-se que a presença e quantidade dos tensoativos não afetaram o diâmetro de partícula.

15 O potencial zeta mostrou que todas as formulações exibem cargas negativas com valores variando entre -25,22 e -36,80 mV, tipicamente observados em sistemas contendo óleos com grupos de ácidos livres. Estes valores de potencial zeta combinados com baixos índices de polidispersividade conduzem a uma dispersão coloidal estável devido à repulsão entre as partículas, a qual inibe sua agregação.

20 O principal componente da formulação, óleo de Neem, pode apresentar ácidos livres ou fosfolipídios carregados negativamente conferindo cargas negativas às nanopartículas.

25 Tipicamente as nanopartículas apresentam diâmetro de partículas entre 30 e 500 nm, pH entre 4,0 e 7,0, polidispersividade entre 0,03 e 0,600, e potencial zeta entre -10 e -50,0.

Os valores de pH, diâmetro de partícula, polidispersão e potencial zeta para uma série de Exemplos de nanocápsulas de Neem preparadas pelo método descrito podem ser observados na Tabela 3.

TABELA 3

Exemplo*	pH	Diâmetro de partículas (nm)	Polidispersividade	Potencial zeta (mV)
1	4,87 ± 0,19	231,3 ± 18,89	0,490 ± 0,180	-36,80 ± 0,167
2	4,84 ± 0,11	243,0 ± 19,03	0,029 ± 0,007	-29,94 ± 4,439
3	4,77 ± 0,17	213,3 ± 11,51	0,321 ± 0,082	-25,22 ± 2,104
4	4,95 ± 0,12	212,5 ± 10,37	0,005 ± 0,002	-28,54 ± 2,961
5	6,53 ± 0,11	177,4 ± 12,38	0,227 ± 0,079	-33,47 ± 2,077
6	6,69 ± 0,13	244,9 ± 15,87	0,119 ± 0,024	-32,84 ± 2,736

* Valores expressam o resultado médio ± desvio padrão ($n = 3$).

O óleo de Neem reduz o pH do meio de dispersão. Porém, a variação na quantidade de óleo nas formulações pouco afetou o valor do pH.

Os tensoativos também pouco afetam o pH das suspensões coloidais.

A partir da Figura 5 pode se observar que o pH reduz em função do tempo. A redução do pH em função do armazenamento à temperatura ambiente pode ser explicada pela degradação polimérica.

Foi observado que o diâmetro de partícula depende mais da quantidade de óleo e extrato do que da quantidade ou tipo de polímero empregado para o encapsulamento.

Por exemplo, num experimento variando a razão óleo de Neem/quantidade de polímero com um conteúdo fixo de óleo não há variação significativa no diâmetro de partículas. O mesmo resultado é encontrado alterando o tipo do polímero (PCL: poli-ε-caprolactona; PHB: Poli-β-hidroxibutirato; PMMA: Poli-metacrilato de metila) (Figura 6).

A estratégia adotada busca principalmente preparar nanopartículas de Neem com elevado conteúdo de azadiractina promovendo um ganho na dispersão deste limonóide em meio aquoso. Observou-se para o método de Fessi, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, R1- R4, 1989 um limite de 75% na eficiência de encapsulamento.

Após o preparo das nanocápsulas de Neem pelo presente processo e análises cromatográficas seguindo os procedimentos descritos acima no presente relatório, foram obtidas suspensões coloidais com aproximadamente 100% de recuperação e de eficiência de 5 encapsulamento para a azadiractina usada no processo.

A Tabela 4 a seguir mostra a caracterização quantitativa de nanocápsulas de Neem em suspensão coloidal obtidas pelo processo da invenção.

TABELA 4

Exemplo	Concentração Nominal * ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação Absoluta (%)	Eficiência de encapsulamento (%)
1	80,0	$101 \pm 9,35$	$\geq 98,0$
2	80,0	$96,7 \pm 5,07$	$\geq 98,0$
3	40,0	$97,6 \pm 8,36$	$\geq 97,5$
4	40,0	$98,1 \pm 7,12$	$\geq 97,5$

10 * para a solução coloidal; Valores expressam o resultado médio \pm desvio padrão ($n = 3$).

A recuperção é determinada avaliando por CLAE primeiramente a quantidade de azadiractina presente no óleo e extratos usados no processo dividido pelo teor total quantificado na suspensão coloidal 15 resultante. Por exemplo, a formulação do Exemplo 1 preparada com 4,00 g de um óleo enriquecido a 4.000,0 mg Kg⁻¹, deve conter no final 8,00 mg de azadiractina num volume final ajustado para 200,0 mL. Esta quantidade equivale ao valor nominal de 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para as formulações descritas na Tabela 2 a eficiência de 20 encapsulamento é superior ao limite de quantificação do método analítico, ou seja, aproximadamente 100%.

Utilizando diferentes quantidades de extratos no preparo de formulações, foi testada a eficiência de encapsulamento da azadiractina em suspensões coloidais com até 3.300,0 mg l⁻¹ (Tabela 5).

Nas formulações de todos os Exemplos a recuperação absoluta e eficiência de encapsulamento são iguais às descritas na Tabela 4.

A eficiência de recuperação foi calculada após quantificação das suspensões coloidais por CLAE tendo como valor de referência a 5 concentração nominal.

O diâmetro de partícula, índice de polidispersão, pH e potencial zeta destas formulações são semelhantes aos descritos na Tabela 3.

TABELA 5

Exemplo	Concentração Nominal * ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação Absoluta (%)	Eficiência de encapsulamento (%)
7	2.200,0	$102,2 \pm 1,89$	$98,7 \pm 0,01$
8	2.800,0	$99,2 \pm 1,03$	$98,8 \pm 0,04$
9	3.400,0	$95,8 \pm 2,00$	$98,8 \pm 0,01$

* Valores expressam o resultado médio \pm desvio padrão ($n = 3$).

10 A solubilidade da azadiractina tendo sido estimada em 26,0 mg 100 mL⁻¹, são preparadas suspensões coloidais (40) em fase aquosa com um conteúdo de azadiractina igual a 340,0 mg 100 mL⁻¹. Este valor representa uma capacidade de dispersão da azadiractina 13 vezes maior que sua solubilidade. Ou seja, é possível preparar uma nova formulação para 15 aplicação de extratos e óleo de Neem com elevados teores de azadiractina, enquanto o teor de surfactantes é mantido baixo (Tween®80 = 0,5% m/v). Deve ficar bem claro para os especialistas que este valor representa um exemplo não limitativo, maiores capacidades de dispersão sendo perfeitamente possíveis conforme o teor de extrato empregado.

20 Para avaliar a formação das nanocápsulas esféricas a morfologia é determinada por análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A remoção da água da dispersão coloidal sobre o porta-amostras metálico requerida para o preparo de amostras para análises morfológicas por MEV promove a aglomeração das nanopartículas formando um filme

polimérico. Contudo, é possível observar nanocápsulas sobre o filme polimérico (Figura 7).

Micropartículas de nanocápsulas

As suspensões coloidais geralmente possuem uma estabilidade 5 físico-química limitada. Longos tempos de armazenamento podem favorecer o crescimento microbiano e a hidrólise polimérica. Muitas vezes, por conveniência, a transformação destes sistemas líquidos em pó se torna uma estratégia viável. As nanopartículas em pó podem apresentar uma maior estabilidade, além de reduzir o volume de armazenamento e 10 peso para transporte.

As nanopartículas de fato, são aprisionadas numa matriz sólida seca (micropartículas em pó) após sua interação com partículas de sílica antes da secagem. Durante o processo de secagem há a formação de aglomerados de sílica circunvizinhada por uma ou várias nanocápsulas de 15 Neem cobrindo a superfície das micropartículas, vide Pohlmann, A.R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16, 305–312, 2002.

Este processo pode prevenir a agregação irreversível de 20 nanocápsulas, vide Tewa-Tagne, P. et al. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: formulation aspects, liquid phase interaction and particles characteristics. *Int. J. Pharm.* 325, 63-74, 2006.

O dióxido de silício coloidal como suporte de secagem mostrou ser 25 um bom candidato. Entre as vantagens, o silício coloidal pode originar uma grande área superficial e possuir uma boa condutividade térmica favorável à remoção de água. Além disso, é um material biocompatível, atóxico sendo considerado seguro inclusive para preparo de medicamentos.

No desenvolvimento do processo de secagem são utilizadas nanocápsulas de diâmetro de partícula inferior a 300 nm, com cargas negativas relativas ao potencial zeta (~ -30 mV).

Conforme proposto por Pohlmann, A.R. no artigo citado logo acima no presente relatório e no artigo por Tewa-Tagne, P. igualmente citado logo acima no presente relatório, o rendimento foi avaliado pela porcentagem de sílica (Aerosil®200) utilizada no processo de secagem por Spray-Dryer.

No preparo das micropartículas em pó (**60**) por combinação de nanocápsulas (**50**) com suporte de secagem (p.ex., sílica) em Spray-Dryer as proporções nanocápsulas/sílica variam entre 1:0,2 a 1:2 m/m.

Os dados estão compilados na Tabela 6 abaixo.

TABELA 6

Amostras	Conteúdo na preparação % (m/v)		Rendimento (%)
	Nanocápsulas	Sílica	
10	1,0	0,5	$72,1 \pm 1,9$
11	1,0	1,0	$78,9 \pm 2,2$
12	1,0	1,5	$80,5 \pm 1,3$
13	1,0	2,0	$78,7 \pm 1,5$
14	2,0	1,0	$52,3 \pm 4,6$
15^a	2,0	1,0	$39,1 \pm 6,9$

^a Formulação isenta de Span® 60.

* Valores expressam o resultado médio \pm desvio padrão ($n = 3$).

Nas diferentes formulações usadas na alimentação do Spray-Dryer com 1,0% de nanocápsulas os melhores rendimentos foram obtidos para uma quantidade de sílica superior a 1,0%. Abaixo desta composição foi observada a formação de um filme nas paredes do ciclone procedente da adsorção do material das nanocápsulas e sílica (Amostra 10). O mesmo perfil foi observado com o aumento da quantidade de nanocápsulas em relação à quantidade de sílica (Amostra 14).

Os piores resultados de recuperação foram obtidos para nanopartículas preparadas sem o tensoativo Span®60 (Amostra 15) conduzindo a uma forte adsorção nas paredes do ciclone.

5 Os dados da Tabela 6 demonstram a importância do controle das quantidades dos componentes submetidas ao processo de secagem por Spray-Dryer.

A recuperação de partículas em pó de micropartículas de Neem/sílica demonstrou um rendimento aceitável para o processo de Spray-Drying.

10 Os parâmetros operacionais do equipamento Spray-Dryer incluindo taxa de alimentação, vazão do ar atomizador, capacidade do aspirador e temperatura de entrada foram tais que permitiram obter uma temperatura de saída de 50 ± 5 °C favorável à não decomposição térmica de compostos sensíveis como a azadiractina.

15 A forma e a morfologia das micropartículas em pó de nanocápsulas de Neem obtidas no processo de secagem por Spray-Drying podem ser observadas na Figura 8.

20 Micropartículas em pó esféricas bem separadas foram obtidas com diversos diâmetros variando entre 1 e 10 µm. O formato esférico demonstra ausência de efeitos de desestabilização durante o processo de secagem.

Através da análise por MEV com altas ampliações (Figura 8c), nanocápsulas foram observadas sobre as micropartículas em pó apresentando um diâmetro médio reduzido (< 100 nm).

25 O mesmo comportamento foi observado e descrito por Pohlmann, A.R. no artigo já mencionado acima no presente relatório.

As superfícies das partículas apresentaram um aspecto rugoso com uma camada porosa de nanopartículas e sílica. Embora as preparações sejam homogêneas, a dispersão no diâmetro de partículas é originário do bico do sistema de atomização que produz gotas com uma ampla faixa de

tamanhos. Assim, diferentes tamanhos de gotas conduzem a uma ampla dispersão de diâmetro de partículas.

A fusão de partículas na etapa final de secagem também pode produzir maiores aglomerados.

5 A análise quantitativa do conteúdo de azadiractina por CLAE foi realizada conforme descrito acima no presente relatório.

Formulações preparadas com diferentes quantidades de azadiractina em óleos enriquecidos e extratos de Neem conduziram à preparação de micropartículas em pó com variados conteúdos de 10 azadiractina proporcional à massa total da formulação.

A quantidade final de azadiractina nas micropartículas em pó variou entre 1.600,0 mg Kg⁻¹ a 6.800,0 mg Kg⁻¹. Contudo, este resultado ilustra apenas os valores de alguns experimentos, a quantidade de azadiractina podendo variar amplamente dependendo do teor de azadiractina no óleo e 15 nos extratos de Neem e da quantidade dos mesmos empregados na formulação. Em um exemplo não limitativo, é possível preparar micropartículas em pó com teores de 10.000 mg Kg⁻¹, dependendo da quantidade e qualidade do extrato de Neem utilizado.

A avaliação da interação polímero-produtos de Neem foi realizada 20 por termogravimetria (TG) e a derivada da termogravimetria (DTG). Neste estudo, a interação físico-química entre os constituintes da formulação foi analisada para prever o comportamento térmico e biodegradável das micropartículas. A perda de massa foi entre 45 e 50%, proporcional à composição das formulações e à quantidade de sílica utilizada.

25 As formulações avaliadas encontram-se listadas na Tabela 7.

TABELA 7

Formulação	Polímero (PCL)	Extrato de Neem	Óleo de Neem	Span®60	Tween®80
A	Sim	Não	Não ^a	Sim	Sim
B	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
C	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D	Não	Sim	Não	Sim	Sim
E	Não	Não	Não ^a	Sim	Sim

^a Nesta composição foi utilizado oleato de isodecila

Claramente foi possível identificar diferentes eventos térmicos para perdas de massa em decorrência do material presente. Devido à substituição do óleo de Neem por oleato de isodecila as formulações não apresentaram necessariamente os mesmos eventos térmicos. Contudo importantes observações podem ser apresentadas.

Formulações A a E contendo extratos e óleos de Neem apresentaram uma curva de degradação tardia comparadas às formulações isentas de extratos e/ou óleo de Neem (Figura 9A – curva de TG, Figura 9B, curva de DTG). Justifica o fato, ser o primeiro evento térmico resultado da decomposição dos extratos de Neem e/ou óleos utilizados na formulação. O segundo evento ocorre pela degradação do Span®60 e Tween®80. Comparando a formulação de PCL com óleo de Neem (B – Tabela 7 acima) e PCL com oleato de isodecila (B – Tabela 7 acima) se observa que o óleo de Neem retarda a degradação do Span®60 e Tween®80. O último evento ocorre pela degradação do polímero. Após estes eventos a decomposição do material ocorre lentamente provavelmente pela eliminação de materiais carbonados.

20 **Estabilidade das nanopartículas**

A estabilidade das nanopartículas em suspensão coloidal e em micropartículas em pó submetidas à radiação de Ultravioleta é reportada em termos de porcentagem residual de azadiractina (Figura 10).

Como padrões de referência são utilizadas duas amostras de óleo de Neem não encapsulado sendo uma exposta à radiação ultravioleta (E –

Figura 10) e outra revestida ao abrigo da radiação ultravioleta (F – Figura 10). Durante o período avaliado, as amostras foram continuamente homogeneizadas.

A velocidade de degradação da amostra de óleo de Neem exposta 5 à radiação ultravioleta foi muito superior se comparada com as amostras nanoencapsuladas.

A amostra de óleo protegida da radiação ultravioleta não apresentou sinais de fotodegradação durante o período investigado.

Diferentes velocidades de degradação ultravioleta também foram 10 observadas entre nanopartículas em pó (A e B – Figura 10) e em suspensão coloidal (C e D – Figura 10).

A velocidade de degradação das nanocápsulas em suspensão coloidal foi maior que das nanopartículas em pó. Esta diferença pode ser explicada pelo intumescimento do polímero e liberação da azadiractina em 15 meio aquoso e pela habilidade das nanopartículas de sílica de absorver ou refletir radiação ultravioleta. Além disso, no pó há uma menor penetração ultravioleta. Amostras contendo Span[®]60 (B e D – Figura 10) apresentam uma menor fotodegradação do que amostras sem Span[®]60 (A e C – Figura 10).

20 Quando as amostras foram irradiadas por 7 dias a quantidade de azadiractina fotodegradada no óleo exposto foi aproximadamente 100% enquanto que nas amostras de nanopartículas em pó e em suspensão coloidal eram de 90% e 55% respectivamente. Depois de 14 dias a quantidade de azadiractina fotodegradada nas nanopartículas em pó e em 25 suspensão coloidal eram de 25% e 72% respectivamente.

Os valores das constantes de fotodegradação (dias^{-1}) da azadiractina são descritos na Tabela 8 a seguir no presente relatório.

A diferença entre os valores das constantes de fotodegradação confirma que a azadiractina foi encapsulada e parcialmente protegida, 30 principalmente em matrizes sólidas. Um objetivo da presente investigação

foi determinar a eficiência de fotodegradação necessária para reduzir a quantidade de azadiractina a 50% do valor inicial sob condições aceleradas, de amostras de azadiractina não-encapsuladas e encapsuladas (Tabela 8).

5 A partir dos dados da Tabela 8 fica evidente a diferença de estabilidade ultravioleta entre as amostras, sendo as nanopartículas em pó mais estáveis que aquelas em suspensão coloidal.

Como esperado, o óleo não-encapsulado é o que oferece a menor fotoproteção para a azadiractina.

10

TABELA 8

Amostras	Constantes de fotodegradação ^a (k , dias ⁻¹)	Eficiência de fotodegradação ^b (dias)
Óleo de Neem exposto a radiação UV	0,50010	1,39
Óleo de Neem protegido da radiação UV	0,00110	630
A – NP em pó (sem Span®60)	0,02014	34,4
B – NP em pó (com Span®60)	0,01271	54,5
C – NP em suspensão coloidal (sem Span®60)	0,09923	6,98
D – NP em suspensão coloidal (com Span®60)	0,08902	7,78

^a Constantes para cinética de primeira ordem: $\ln[Aza]_t/[Aza]_0 = -kt$

^b Tempo de radiação necessário (em dias) para reduzir a quantidade de azadiractina em 50% do seu valor inicial.

15 Estudo de liberação de azadiractina de nanocápsulas de PCL

A cinética de liberação foi investigada para as nanocápsulas de maior estabilidade ultravioleta, isto é, nanocápsulas formuladas com Span®60. O sistema projetado sob fluxo constante evita a saturação do

sistema e, consequentemente, o equilíbrio de solubilidade. Neste ensaio somente a azadiractina não-encapsulada possui a capacidade de passar através dos poros da bolsa de diálise.

O perfil da liberação *in vitro* pode ser observado na Figura 11. O tempo necessário para liberação de 100% da azadiractina foi de 10 horas sendo 85% liberada nas quatro primeiras horas.

O valor de n é um parâmetro empírico obtido na equação de Korsmeyer, R.W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25-35, 1983, usado para caracterizar o mecanismo de liberação com base na Equação a seguir:

$$M_t/M_\infty = K \cdot t^n$$

onde M_t/M_∞ é a fração de liberação no tempo t , n é o expoente de liberação e K o fator de liberação.

De acordo com o valor numérico que n assume é possível caracterizar o mecanismo de liberação do fármaco. Esta equação semi-empírica é utilizada para descrever a liberação do soluto (azadiractina). Neste caso para valores de $n \leq 0,45$ o principal mecanismo que controla a liberação da azadiractina é a difusão pura (Fickiana clássica).

Quando n assume valores entre $0,45 < n \leq 0,89$ indica cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos mecanismos de difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte não-Fickiano (Caso-II), controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas.

O valor de n determinado pelo coeficiente angular do gráfico $\log(M_t/M_\infty)$ versus $\log(t)$ para a azadiractina foi de 2,49 ($> 0,89$) correspondendo a cinética de primeira ordem sendo a liberação controlada por mecanismos de transporte decorrentes do fenômeno de intumescimento e relaxamento do polímero ou liberação mediante erosão.

Os resultados indicam que nanocápsulas de PCL contendo óleo e extratos de Neem em suspensão coloidal são satisfatoriamente preparadas pelo método proposto.

Nanocápsulas de Neem em pó podem ser facilmente preparadas 5 pela secagem das suspensões coloidais por Spray-Dryer.

Os produtos apresentam boa homogeneidade e estabilidade em suspensão coloidal e em pó. A taxa de associação (eficiência de encapsulamento), monitorada pela azadiractina, foi de aproximadamente 100% sendo o perfil de liberação *in vitro* estipulado para cinética de ordem 10 zero, ou seja, governado pelo intumescimento e relaxação polimérica.

A recuperação da azadiractina determinada nas suspensões coloidais foi de 100% demonstrando não haver perdas de compostos durante o preparo.

Os produtos obtidos pelo processo da invenção apresentam um 15 ganho de estabilidade contra radiação ultravioleta se comparados aos produtos comerciais já disponíveis de óleo de Neem.

O uso de óleo de Neem enriquecido com extratos de Neem possibilitou obter produtos com quantidades desejadas e reproduzíveis de azadiractina.

20 A técnica analítica desenvolvida e validada de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi eficiente no controle quantitativo de azadiractina em extratos, óleos e nas nanopartículas, tal controle sendo necessário para a preparação e caracterização das nanopartículas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de nanopartículas biopoliméricas contendo óleo e extratos de *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem), dito processo sendo caracterizado por compreender as etapas de:
 - 5 a) A partir de amêndoas de Neem moídas com diâmetro médio de partícula entre 10 e 30 μ m prover óleo enriquecido com desde 1 até 10.000 mg kg⁻¹ de azadiractina usando extratos de Neem;
 - b) Formar em (10) uma nanoemulsão aquosa (Fase I) por vigorosa agitação por entre dois e sete minutos de entre 0,5 e 10% (m/v) do dito óleo de Neem, entre 0,1 e 5% (m/v) de extratos de Neem da etapa a), e entre 0,1 a 2 % m/v de um tensoativo não iônico selecionado dentre monoestearato de sorbitano;
 - 15 c) Dissolver em (20) sob agitação e aquecimento a 40°C-50°C entre 0,1 e 2,0 % (m/v) de um biopolímero em solvente orgânico polar selecionado dentre acetona e álcool etílico e suas misturas em qualquer proporção, obtendo uma solução de biopolímero no dito solvente (Fase II);
 - d) verter via L1 lentamente a solução de biopolímero da etapa
 - c) com o auxílio de uma bomba peristáltica sobre a nanoemulsão da etapa a) sob agitação, com difusão do solvente orgânico na fase aquosa via L3 e deposição do polímero na interface óleo-água resultando, por mistura da Fase I e Fase II, em suspensões coloidais de nanopartículas biopoliméricas pré-formadas (40) com pH entre 4,0 e 7,0, as ditas suspensões se estabilizando por um período de tempo de 10 minutos;

5 e) preparar em (30) uma terceira fase aquosa (Fase III), contendo entre 0,1 e 2% m/v de um tensoativo não iônico da classe dos oleatos de polietoxisorbitano, e adicionar a mesma sobre as nanocápsulas pré-formadas de d), sob agitação, para garantir a estabilidade da dispersão coloidal obtida por ação dispersante do tensoativo adsorvido sobre as nanopartículas;

10 f) agitar moderadamente a dispersão coloidal da etapa e) por um período de 10 minutos e mais 30 minutos em repouso de modo a obter a dita dispersão estabilizada;

15 g) ajustar o volume final das nanopartículas (40) em dispersão coloidal da etapa f) retirando via L4 parte da água da dispersão sob vácuo; e

h) recuperar as nanopartículas biopoliméricas (50) sob forma de nanocápsulas contendo óleo e extratos de *Azadiractha indica* (A. Juss.) em dispersão coloidal prontas para uso.

20 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por alternativamente a carga da etapa a) ser isenta de extrato de Neem.

25 3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por alternativamente a nanoemulsão da etapa b) ser isenta de tensoativo não iônico.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por alternativamente preparar as nanopartículas (40) em ausência de adição via L2 da solução aquosa de tensoativo da Fase III.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por na etapa c) o biopolímero ser selecionado dentre gelatina, quitosana, alginato de sódio, ciclodextrinas, celulose, fécula de mandioca,

poli- ϵ -caprolactona (PCL), polihidroxialcanoatos (PHAs), polimetilmetacrilato (PMMA) e os poliésteres alifáticos.

- 5 6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por os poliésteres alifáticos serem selecionados dentre os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA).
- 10 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o biopolímero ser PLA.
- 15 8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as suspensões coloidais (40) da etapa d) apresentarem capacidade de dispersão de azadiractina superior à solubilidade da mesma, incluindo 13 vezes superior, para teores reduzidos de tensoativo, de 0,5% m/v.
- 15 9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a nanopartícula (50) da etapa h) ser seca via L5 por Spray-Drying após combinação com um suporte selecionado dentre sílica coloidal na proporção entre 1:0,2 a 1:2 m/m de nanopartícula (50) para sílica para obter micropartículas em pó (60).
- 20 10. Nanopartículas biopoliméricas preparadas pelo processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por, na etapa g) compreenderem óleo de Neem, 2 % (m/v), extrato de Neem, 0,5 % (m/v), tensoativo Span[®]60, 0,5 % (m/v), polímero, 0,5 % (m/v) e tensoativo Tween[®]80 0,5 % (m/v).
- 25 11. Nanopartículas biopoliméricas de acordo com a reivindicação 10, caracterizadas por apresentarem diâmetro de partículas entre 30 e 500 nm, polidispersividade entre 0,03 e 0,600, e potencial zeta entre -10 e -50,0 mV.
12. Nanopartículas biopoliméricas de acordo com a reivindicação 10, caracterizadas por apresentarem valor de recuperação absoluta de azadiractina de 97,6 \pm 8,36 e valor de eficiência de

encapsulamento de 97,5% para concentração nominal de azadiractina de $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ até valor de recuperação absoluta de $102,2 \pm 1,89$ e valor de $98,7 \pm 0,01$ de eficiência de encapsulamento para concentração nominal de azadiractina de $2.200,00 \mu\text{g ml}^{-1}$.

- 5
13. Micropartículas em pó preparadas de acordo com o processo da reivindicação 1, caracterizadas por serem esféricas, com diâmetro de partícula entre 1 e $10 \mu\text{m}$.
 14. Micropartículas de acordo com a reivindicação 13, caracterizadas por serem obtidas a partir de nanopartículas (40) preparadas em ausência de adição de solução aquosa de tensoativo da Fase III via L2.
 15. Micropartículas de acordo com a reivindicação 13, caracterizadas por a quantidade final de azadiractina nas micropartículas em pó variar entre $1.600,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $10.000,0 \text{ mg Kg}^{-1}$.

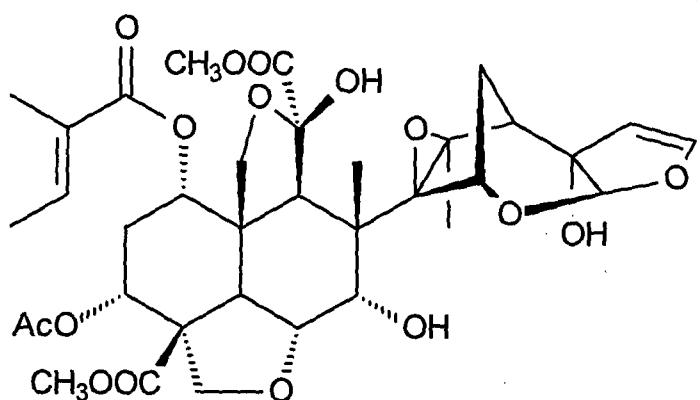
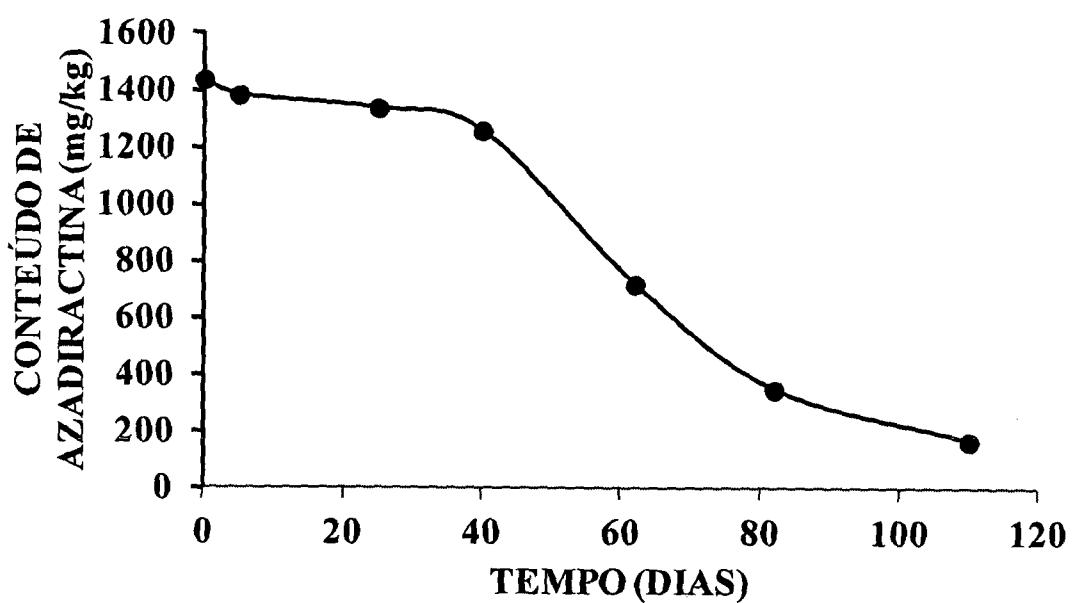
FIG. 1**FIG. 2**

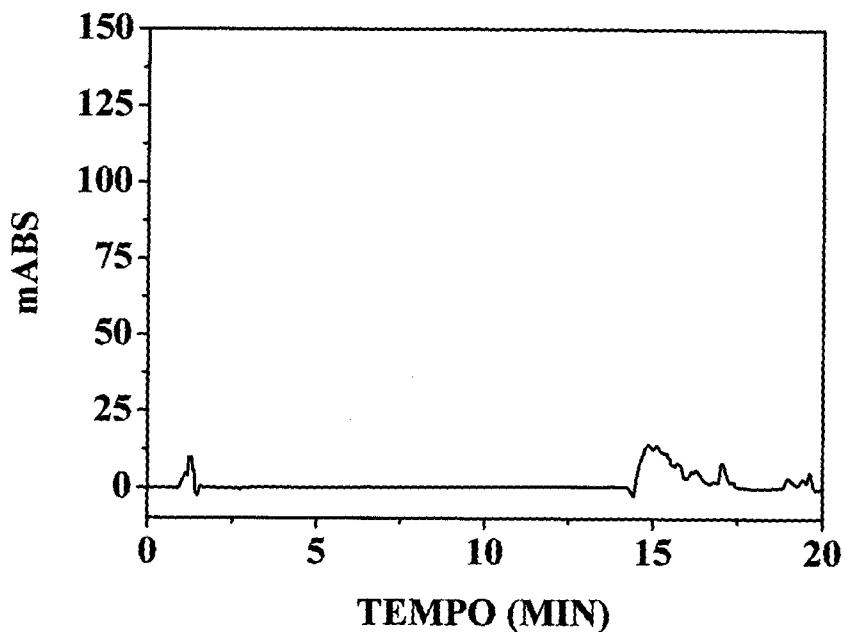
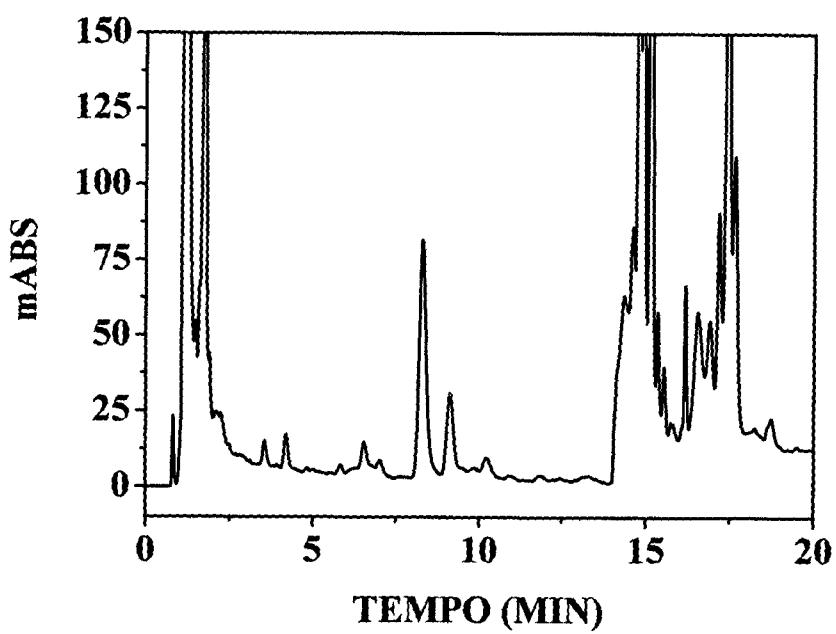
FIG. 3A**FIG. 3B**

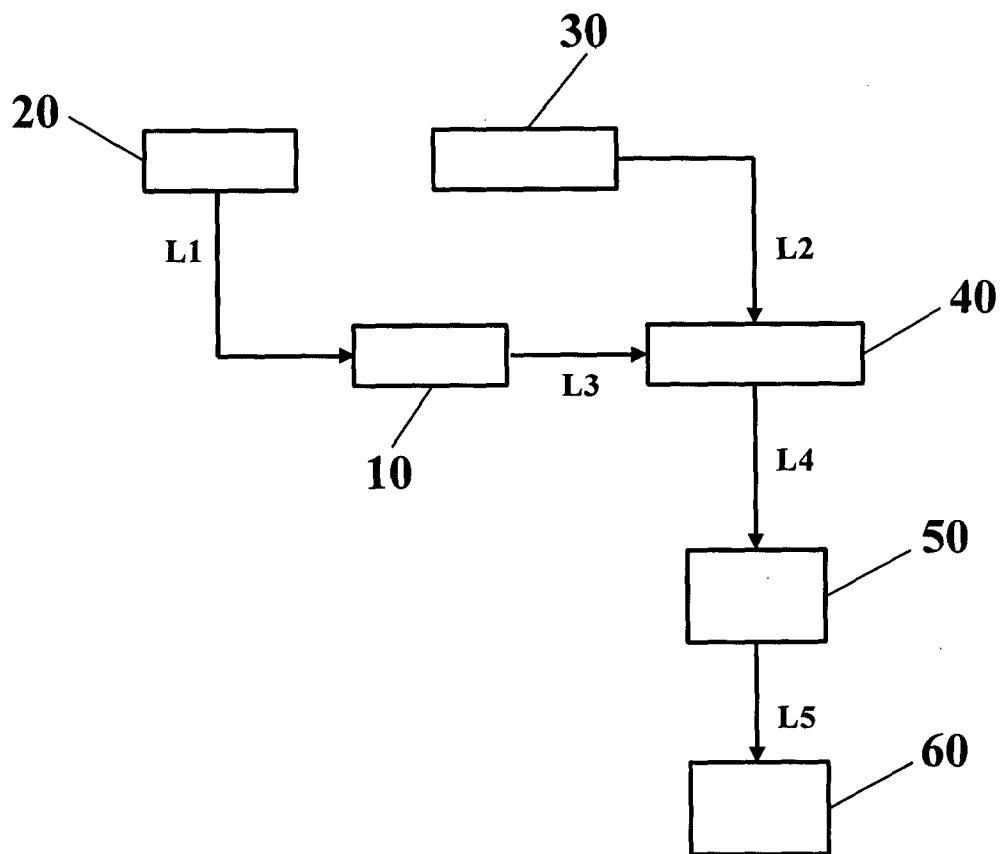
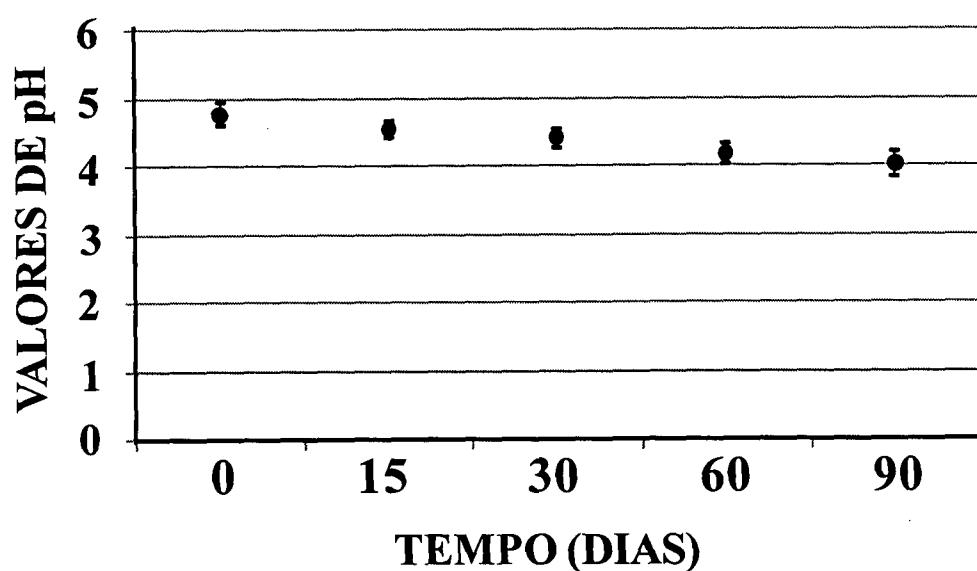
FIG. 4**FIG. 5**

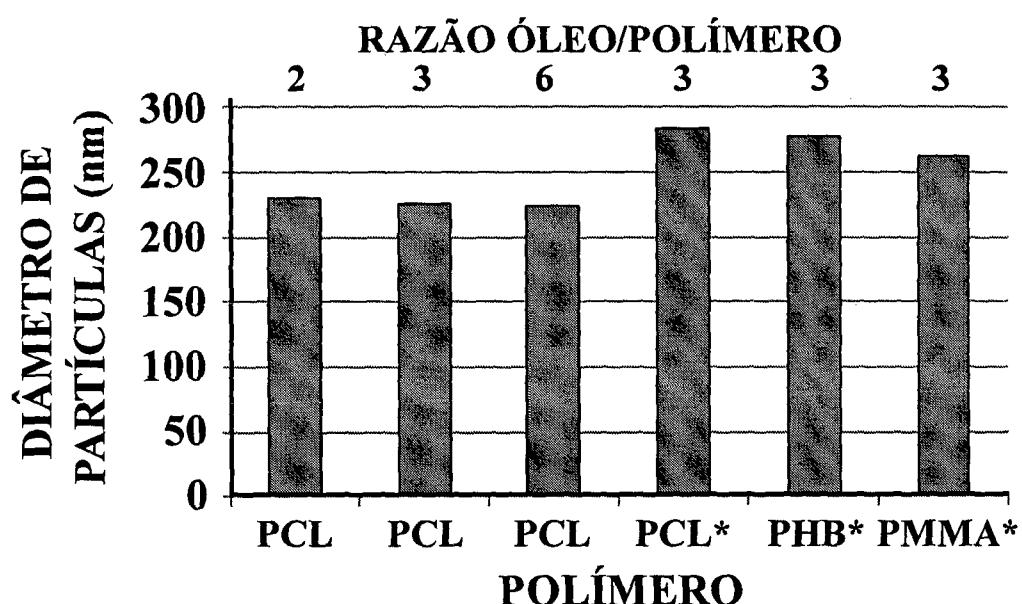
FIG. 6

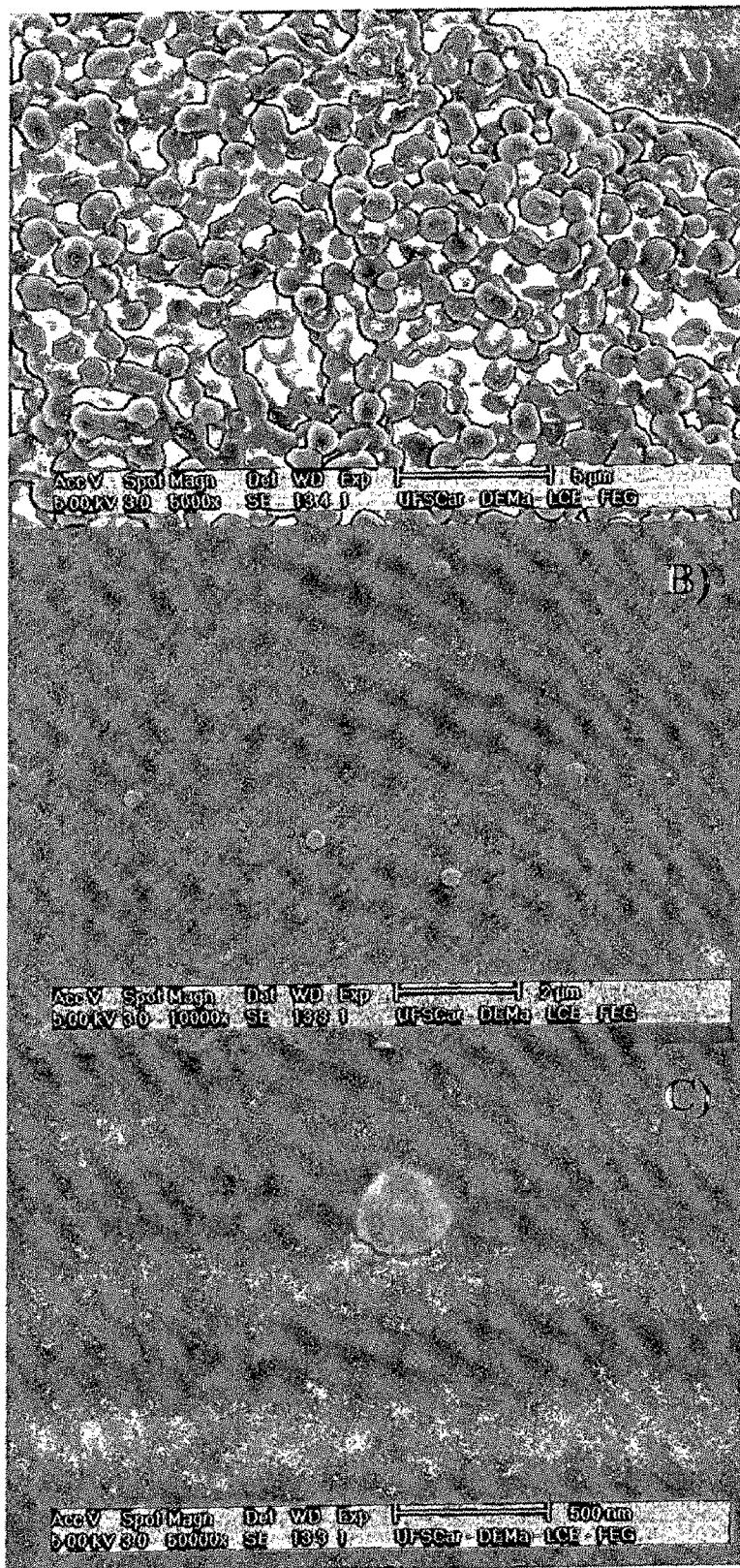
FIG. 7

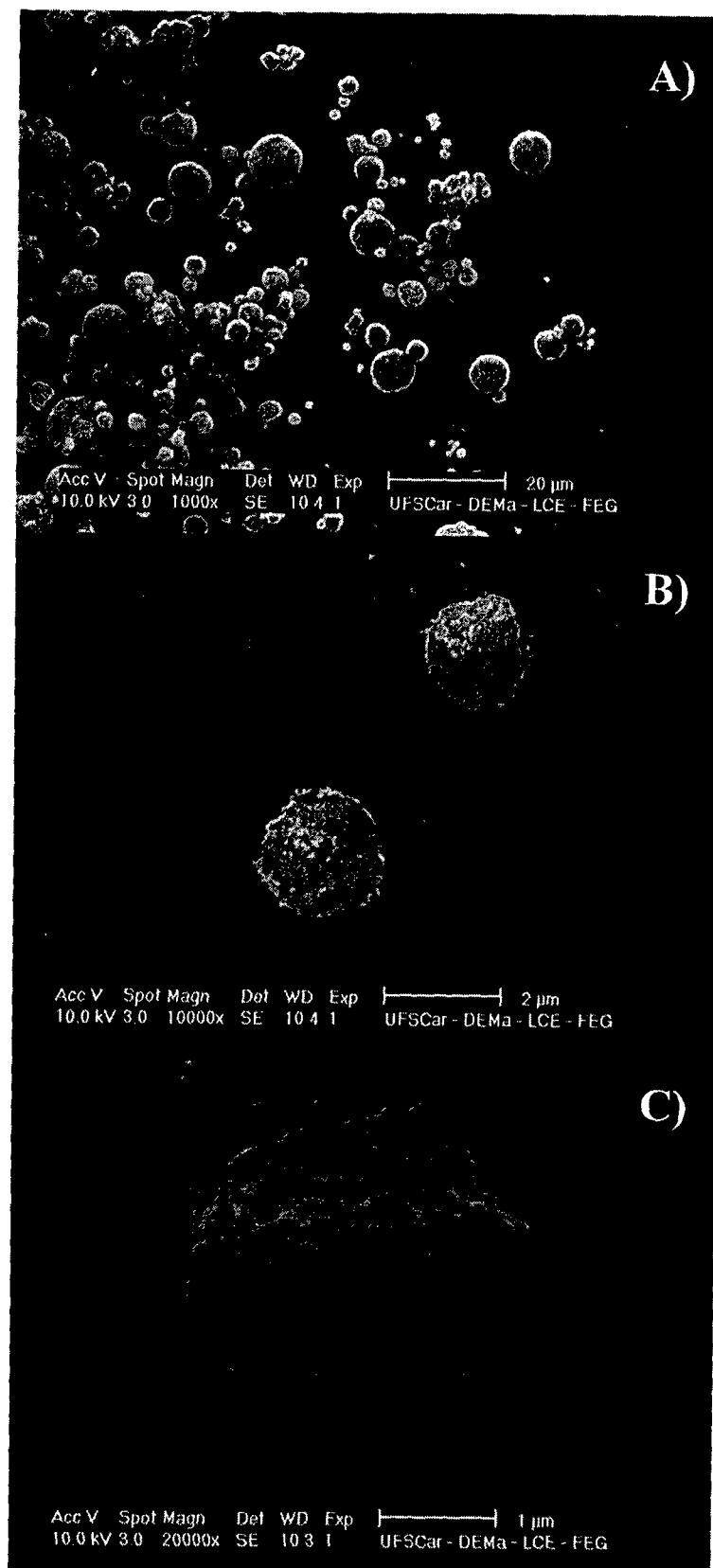
FIG. 8

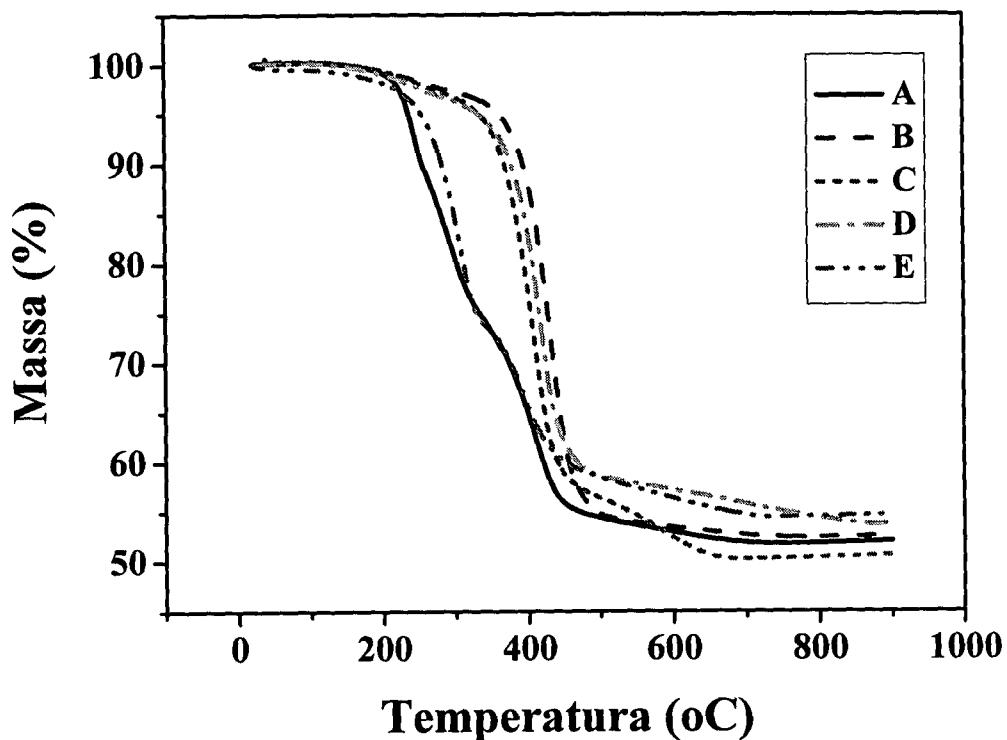
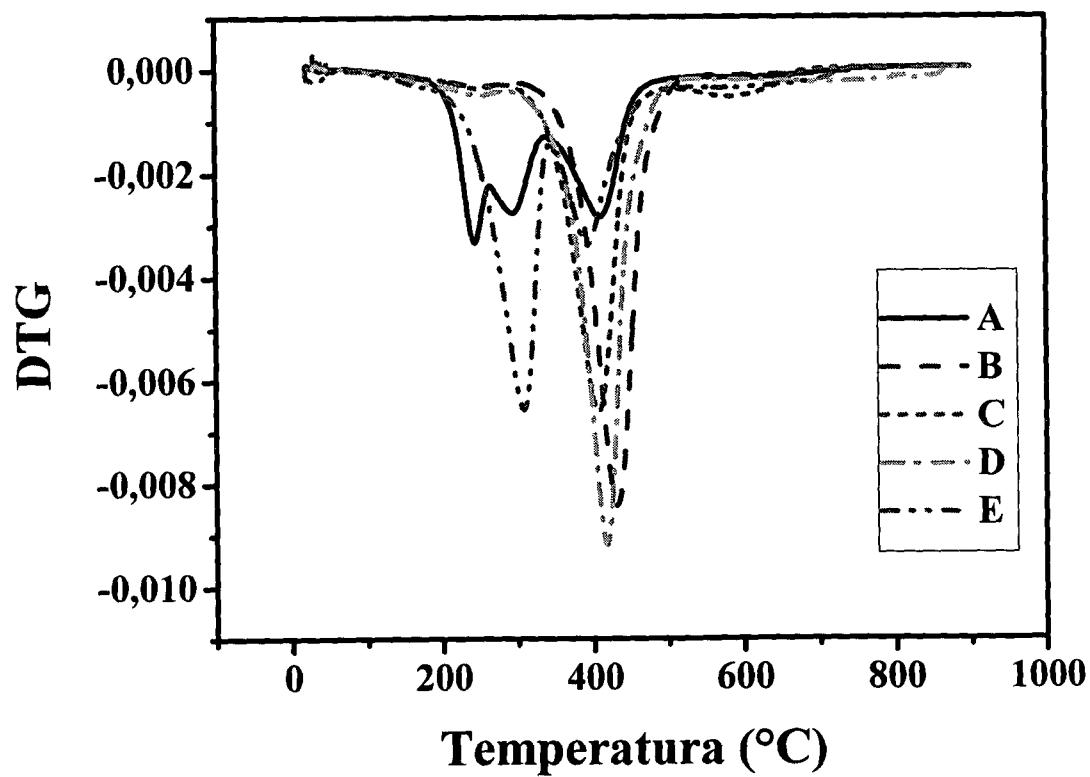
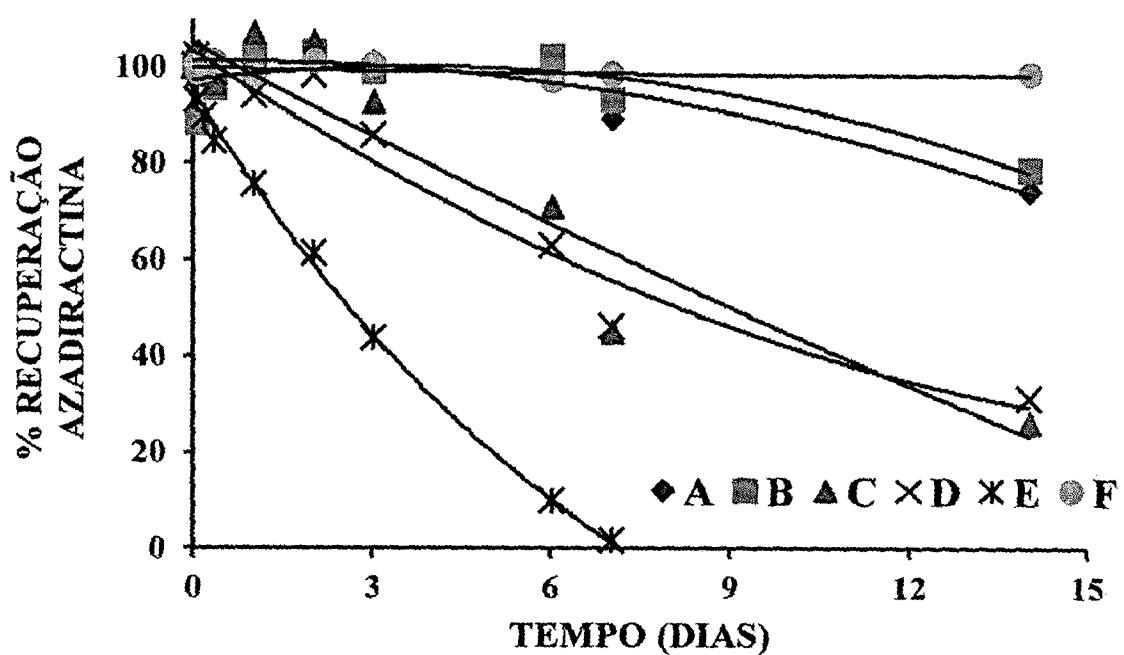
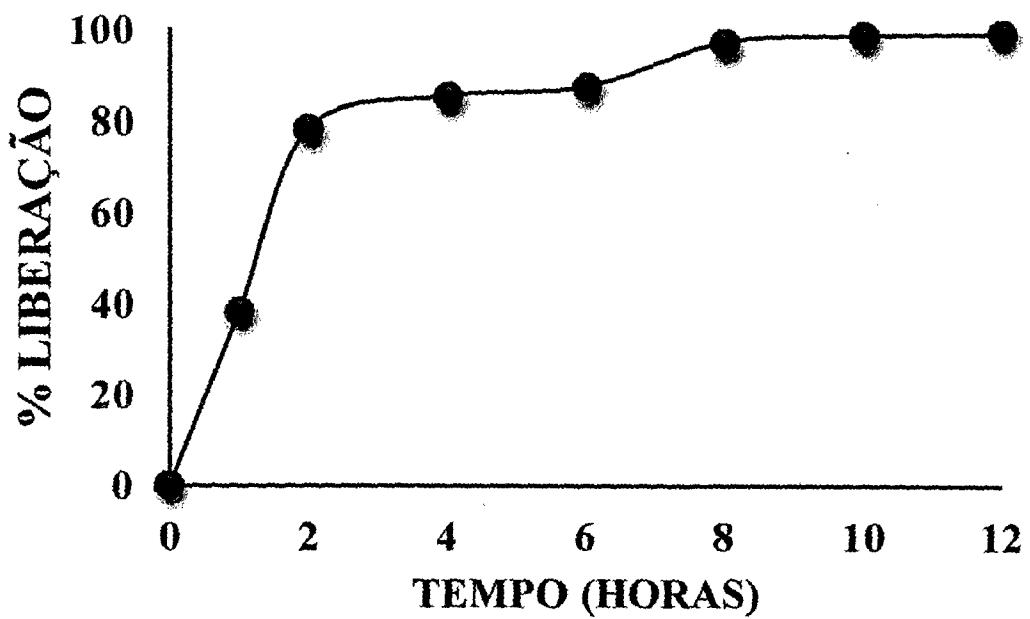
FIG. 9A**FIG. 9B**

FIG. 10**FIG. 11**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2014/000044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 25/00 (2006.01), A01N 25/04 (2006.01), A01N 25/28 (2006.01), A01N 31/14 (2006.01),

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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

A01N

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

EPODOC, GOOGLE PATENTS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008032328 A2 (LEVI-RUSO GANIT [IL]) 20 march 2008 (20.03.2008) see the whole document	1 a 15
A	WO 2005095031 A1 (SHANKAR SHIV S. [IN]) 13 october 2005 (13.10.2005) see the whole document	1 a 15
A	SCHAFFAZICK, S. R. <i>et al.</i> "Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin". J. Braz. Chem. Soc., Vol. 17, Nº: 3, p. 562-569, 2006. see the whole document	1 a 15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21/03/2014

Date of mailing of the international search report

090514

Name and mailing address of the ISA/

INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Rua Sao Bento nº 1, 17º andar

Facsimile No.

Authorized officer

Paula Salles de Oliveira Martins

+55 21 3037-3984/3742

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/BR2014/000044

WO 2008032328 A2	2008-03-20	AR 063704 A1 CL 26392007 A1 EP 2061311 A2 IL 197524 D0 US 2010015236 A1 WO 2008032328 A3	2009-02-11 2008-06-20 2009-05-27 2009-12-24 2010-01-21 2009-05-07
WO 2005095031 A1	2005-10-13	NONE	

RELATORIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2014/000044

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A01N 25/00 (2006.01), A01N 25/04 (2006.01), A01N 25/28 (2006.01), A01N 31/14 (2006.01),

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

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

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

A01N

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

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

EPODOC, GOOGLE PATENTS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
A	WO 2008032328 A2 (LEVI-RUSO GANIT [IL]) 20 março 2008 (2008-03-20) Ver documento inteiro	1 a 15
A	WO 2005095031 A1 (SHANKAR SHIV S. [IN]) 13 outubro 2005 (2005-10-13) Ver documento inteiro	1 a 15
A	SCHAFFAZICK, S. R. et al. "Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin". J. Braz. Chem. Soc., Vol. 17, Nº. 3, p. 562-569, 2006. Ver documento inteiro	1 a 15

 Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

21/03/2014

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

090514

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua São Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
Nº de fax: +55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Paula Salles de Oliveira Martins
Nº de telefone: +55 21 3037-3984/3742

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2014/000044

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
WO 2008032328 A2	2008-03-20	AR 063704 A1 CL 26392007 A1 EP 2061311 A2 IL 197524 D0 US 2010015236 A1 WO 2008032328 A2	2009-02-11 2008-06-20 2009-05-27 2009-12-24 2010-01-21 2009-05-07
WO 2005095031 A1	2005-10-13	Nenhum	