



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 009921 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 46068425000133

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13084-971

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: patentes@inova.unicamp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS NATURAIS COM INTRÍNSECA AÇÃO ANESTÉSICA, BACTERICIDA, ANTIFÚNGICA E BIOPESTICIDA

Resumo: A presente invenção se relaciona a formulações compreendendo carreadores lipídicos nanoestruturados. Especificamente, a formulação ora pleiteada compreende nanopartículas carreadoras lipídicas (NLC) naturais cuja composição estritamente natural permite o encapsulamento de óleos essenciais com notável perfil de estabilidade mantendo tamanho e uma distribuição de diâmetro médio homogêneos após 1 ano de monitoramento em temperatura ambiente. Tal característica permite a obtenção de uma pluralidade de efeitos intrínsecos, com ação anestésica, bactericida, antifúngica e biopesticida contra lagartas, carunchos e ácaros, sem exigir o encapsulamento de princípios ativos sintéticos.

Figura a publicar: 15

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Frateschi

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 05923951894

Endereço: Avenida ENgenheiro Luiz ANtonio Laloni 321

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13086906

Telefone: 1935215262

Fax:

Email: patentes@inova.unicamp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 15

Nome: LÍGIA NUNES DE MORAIS RIBEIRO

CPF: 34541758873

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Monteiro Lobato, 255

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13082-865

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 16144

Fax:

Email: nuneslica@gmail.com

Inventor 2 de 15

Nome: ENEIDA DE PAULA

CPF: 03953663801

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Dr. Olímpio da Silva Miranda, 289

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13083-010

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 16143

Fax:

Email: depaula@unicamp.br

Inventor 3 de 15

Nome: SIMONE RAMOS DE CASTRO

CPF: 78828988215

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Av. Santa Isabel, 193

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13084-012

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 16144

Fax:

Email: simonercastro@hotmail.com

Inventor 4 de 15

Nome: LUDMILLA DAVID DE MOURA

CPF: 10630779660

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Romeu Tórtima, 770. Apt 11

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13084-791

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 16144

Fax:

Email: ludmilladavidm@gmail.com

Inventor 5 de 15

Nome: MARCELO LANCELLOTTI

CPF: 25534567864

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Áustria ,177

Cidade: Americana

Estado: SP

CEP: 13471-620

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 18128

Fax:

Email: marcelo.lancellotti@fcf.unicamp.br

Inventor 6 de 15

Nome: MÁRCIA CRISTINA BREITKREITZ

CPF: 29837713852

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua do Sol, 148 Edifício Acácia apto 31

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13085-260

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 13028

Fax:

Email: marciacristinab@iqm.unicamp.br

Inventor 7 de 15

Nome: VIVIANE APARECIDA GUILHERME DAMASIO

CPF: 31836371896

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Dr Mauro Brandemburgo 814 j 31

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13098-421

País: BRASIL

Telefone: (19) 992 464318

Fax:

Email: viguilherme@gmail.com

Inventor 8 de 15

Nome: GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

CPF: 29537328880

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Angelo Varandas, 93

Cidade: Paulínia

Estado: SP

CEP: 13140-000

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 16144

Fax:

Email: gustavohrs@gmail.com

Inventor 9 de 15

Nome: LEONARDO FERNANDES FRACETO

CPF: 20633995819

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rodovia Raposo Tavares km 82, Condomínio Recanto dos Pássaros, Lote 3 Quadra D.

Cidade: Alumínio

Estado: SP

CEP: 18125-990

País: BRASIL

Telefone: (15) 323 83456

Fax:

Email: leonardo.fraceto@unesp.br

Inventor 10 de 15

Nome: MÔNICA PASCOLI

CPF: 40425850862

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Avenida Comendador Pereira Inácio, 253, Apartamento 03

Cidade: Sorocaba

Estado: SP

CEP: 18030-005

País: BRASIL

Telefone: (15) 997 177742

Fax:

Email: mo.pascoli@msn.com

Inventor 11 de 15

Nome: FELÍCIA PEREIRA DE ALBUQUERQUE

CPF: 33001760850

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Constantino Verrone, nº 192, bloco 2, apartamento 404

Cidade: Sorocaba

Estado: SP

CEP: 18071-053

País: BRASIL

Telefone: (15) 981 776237

Fax:

Email: felicia.pa@hotmail.com

Inventor 12 de 15

Nome: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

CPF: 50276239091

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Alameda Jose de Oliveira Fagundes, 150

Cidade: Jaboticabal

Estado: SP

CEP: 14890-242

País: BRASIL

Telefone: (16) 320 97306

Fax:

Email: r.polanczyk@unesp.br

Inventor 13 de 15

Nome: DANIEL JUNIOR DE ANDRADE

CPF: 33968213866

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n. Jaboticabal-SP.
Campus da UNESP. Departamento de Fitossanidade – Laboratório
de Acarologia

Cidade: Jaboticabal

Estado: SP

CEP: 14884-900

País: BRASIL

Telefone: (16) 320 97293

Fax:

Email: danieldwv@yahoo.com.br

Inventor 14 de 15

Nome: ANDRÉ RICARDO DE LIMA DAMASIO

CPF: 03964048984

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. João Scarparo Netto 240, apto 226 Nobres

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13080-655

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 11437

Fax:

Email: adamasio@unicamp.br

Inventor 15 de 15

Nome: MARCELO VENTURA RUBIO

CPF: 32028082810

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Pedro Virilo 48, apto 15

Cidade: Indaiatuba

Estado: SP

CEP: 13339-545

País: BRASIL

Telefone: (19) 352 11437

Fax:

Email: marcelov.rubio@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	1377_RELATORIO DESCRITIVO_100519.pdf
Reivindicação	1377_REIVINDICACOES_100519.pdf
Desenho	1377_DESENHOS_100519.pdf
Resumo	1377_RESUMO_100519.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	1377_GRU_211118.pdf
Procuração	PROCURACAO_UNICAMP_110419.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**COMPOSIÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
NATURAIS COM INTRÍNSICA AÇÃO ANESTÉSICA, BACTERICIDA,
ANTIFÚNGICA E BIOPESTICIDA**

Campo da invenção

[001] A presente invenção se relaciona a formulações compreendendo carreadores lipídicos nanoestruturados. Especificamente, a formulação ora pleiteada compreende nanopartículas carreadoras lipídicas (NLC) naturais cuja composição permite o encapsulamento de óleos essenciais com notável perfil de estabilidade, mantendo tamanho e distribuição de diâmetro médio homogêneos mesmo após 1 ano de monitoramento. Em outras palavras, a presente formulação permite a obtenção de uma pluralidade de efeitos terapêuticos intrínsecos, obtidos por meio do encapsulamento de óleos essenciais e ação sinérgica dos demais componentes promotores de ação anestésica, bactericida, antifúngica e biopesticida, sem exigir o encapsulamento de princípios ativos sintéticos.

Fundamentos da invenção

[002] Sistemas nanoestruturados, enquanto adjuvantes na entrega de compostos ativos, vêm emergindo como uma estratégia interessante no desenvolvimento de novos medicamentos, composições cosméticas ou nutracêuticas. Exemplos não-exaustivos incluem lipossomos, *Quantum dots*, dendrímeros, matrizes poliméricas, nanoestruturas de carbono e matrizes lipídicas.

[003] Dentro deste contexto, as matrizes lipídicas se destacam em termos de P&D devido à

compatibilidade destas com uma ampla gama de compostos, possibilidade de modulação de entrega de um dado composto, direcionamento do ativo, além de integrar diferentes funcionalidades.

[004] Dentre as matrizes lipídicas, destacam-se os sistemas de nanopartículas lipídicas sólidas (*Solid Lipid Nanoparticles* ou SLNs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers* ou NLCs).

[005] Sistemas de nanopartículas lipídicas sólidas consistem em lipídeos sólidos estabilizados por emulsionantes apresentando um diâmetro médio inferior a 1000 nm. Algumas de suas principais vantagens residem na escalabilidade industrial e biodegradabilidade, características desejáveis para o desenvolvimento de fármacos, tal como a proposta descrita na patente CN102106821, por exemplo.

[006] Por outro lado, SLNs apresentam diversas restrições em relação à taxa de encapsulação de fármaco ou princípios ativos e a possibilidade de expulsão do princípio ativo no processo de cristalização durante as condições de armazenamento - as alterações polimórficas nas estruturas lipídicas sólidas tendem a remover os compostos previamente encapsulados nos SLNs.

[007] Os sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers* ou NLCs), compreendem um núcleo oleoso formado por lipídeos em fase líquida e em fase sólida em temperatura ambiente, estabilizados por tensoativos. Os lipídios utilizados

comumente como base para preparação dos NLC incluem triglicerídeos, glicerídeos parciais, ácidos graxos, esteroides e ceras. De modo geral, NLCs têm maior capacidade de encapsulação de drogas devido à estrutura cristalina imperfeita, e, por consequência, melhorando a estabilidade do encapsulado solubilizado na matriz.

[008] Outras características compreendem a possibilidade de gerar sistemas de liberação prolongada, além de apresentar um menor perfil de toxicidade quando comparado a sistemas poliméricos (ver, por exemplo, CA2840215, WO2011116963 e WO2012038061), devido à ausência de solventes orgânicos.

[009] Por outro lado, o desenvolvimento de formulações à base de NLCs exigem uma caracterização rigorosa de alguns parâmetros, como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, polimorfismo e encapsulação de fármaco, todos críticos em relação a estabilidade da formulação final. A complexidade dos ensaios realizados para tal fim constitui um desafio para o lançamento de novos medicamentos ou produtos no mercado que empreguem tais sistemas.

[0010] Neste contexto, observa-se um interesse crescente por fármacos que empreguem técnicas que permitam o encapsulamento de óleos essenciais. Estes consistem em metabólitos vegetais formados majoritariamente por compostos mono e sesquiterpênicos e usualmente obtidos por destilação a vapor. Diversos estudos correlacionam tais substâncias a propriedades antimicrobianas, anti-

inflamatórias, antioxidantes, anti-neoplásicas, bem como propriedades antivirais, antifúngicas e antiparasitárias. A natureza hidrofóbica de tais compostos os torna extremamente compatíveis para a encapsulação em NLCs, e, conseqüentemente, excelentes candidatos para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas, considerando também seu baixo preço e grande diversidade.

Descrição do Estado da técnica

[0011] Neste intuito, algumas linhas de pesquisa vêm direcionando esforços para a obtenção de encapsulamento de óleos essenciais como óleo de cravo (*Marques, E. Nanoencapsulação de óleo essencial de cravo em matrizes lipídicas. Tese de conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Engenharia de Alimentos, 2017*), canela (*Wen et al. Nanostructured lipid carriers: a promising topical system for delivering cinnamon oil in wound care treatment Fifth Euro-Mediterranean conference of Natural Products, Limassol, Cyprus, 2018*), óleo de amêndoas (*De Paula, B.O. et al. Desenvolvimento e caracterização de filmes lipídico-biopoliméricos funcionais para liberação transdérmica de lidocaína. XXIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 2016*).

[0012] Algumas metodologias comuns no Estado da Técnica compreendem o emprego de homogeneização sob pressão a quente, tal como a descrita em WO2017185147 ou por Sena (*SENA, L. Obtenção e Caracterização de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados a partir de gordura vegetal de Murumuru, Dissertação Mestrado. Universidade Federal do*

Pará, Instituto de Ciências da Saúde Belém, 2016).

[0013] A partir dos documentos citados no Estado da Técnica, é possível observar que nenhum destes permite a obtenção de formulações nanoencapsuladas composta por excipientes estritamente naturais e com atividade terapêutica intrínseca, tampouco composições que mantenham a estrutura do encapsulado devidamente estabilizada. Tal fato constitui uma severa restrição na viabilização de formulações farmacêuticas naturais que explorem efeitos potencialmente sinérgicos entre óleos essenciais.

Breve descrição da invenção

[0014] Neste sentido, visando contornar as desvantagens relatadas no Estado da Técnica, o presente pedido de patente revela formulações biofuncionais estáveis baseadas em carreadores lipídicos nanoestruturados naturais (NLC) e dotados de ação terapêutica intrínseca e composição estritamente natural.

[0015] As presentes composições são compostas de diferentes matrizes lipídicas estruturais e bioativas, especificamente cera de abelha, palma, manteiga de karité e/ou cacau estabilizadas por biossurfactantes naturais, tais como:

- lauril glicosídeo, por exemplo Plantaren 1200®;
- decilpoliglicosídeo, por exemplo Plantaren 2000®;
- derivado de óleo de coco, tais como: Dietanolamida do Ácido Graxo de coco com 90% mínimo de concentração (por exemplo, Amida 90®); monoetanolamina cocamida (por exemplo, Cocamide®);

- emulsionante olivato de sorbitano, derivado de oliva (por exemplo, Oliva Mil®).

[0016] Mais especificamente, a referida composição compreende de 5 a 20% (m/v) de carreadores lipídicos nanoestruturados estritamente naturais selecionados do grupo que compreende cera de abelha; manteigas de karité; cacau e palma; ou combinação das mesmas; de 1 a 3% (m/v) de óleos essenciais e de 1 a 10 % (m/v) de biossurfactantes.

[0017] A cera de abelha está presente em uma quantidade de 5 a 9% (m/v), as manteigas de karité em uma quantidade de 10 a 20% (m/v, o cacau estar em uma quantidade de 10 a 20% (m/v), o óleo de palma estar em uma quantidade de 10 a 20% (m/v) e os óleos essenciais serem selecionados do grupo compreendendo cravo; canela; cravo-canela; pimenta preta; hortelã ou combinações das mesmas.

[0018] Os biossurfactantes são naturais e selecionados do grupo compreendido por lauril glicosídeo; decilpoliglicosídeo; derivado de óleo de coco; emulsionantes derivados de oliva ou combinações das mesmas. Onde o lauril glicosídeo está presente em uma quantidade de 1 a 10% (m/v), o decilpoliglicosídeo está presente em quantidade de 1 a 10% (m/v), o óleo de coco compreende Dietanolamida do Ácido Graxo de coco (por exemplo, Amida 90®) com 90% mínimo de concentração em uma quantidade de 1 a 5% (m/v), monoetanolamina cocamida está presente em uma quantidade de 1 a 8% (m/v) e o emulsionante derivado de oliva, Olivato de sorbitano, estar presente em uma quantidade de 3% a 10% (m/v).

[0019] Adicionalmente, é objeto da presente invenção uma composição de carreadores lipídicos nanoestruturado compreendendo 10% m/v de manteiga de palma, 3% m/v de óleo essencial de cravo e 2% m/v de lauril glicosídeo na amostra (F1).

[0020] Outro objeto adicional refere-se a uma composição de carreadores lipídicos nanoestruturado compreendendo 10% m/v de manteiga de palma, 3% m/v de óleo essencial de canela e 2% m/v de lauril glicosídeo na amostra (F2).

[0021] Outro objeto adicional refere-se a uma composição de carreadores lipídicos nanoestruturado compreendendo 10% m/v de manteiga de palma, 1,5% m/v de óleo essencial de canela, 1,5% m/v de óleo essencial de cravo, 2% m/v de lauril glicosídeo na amostra (F3).

[0022] Outro objeto de invenção ora proposta refere-se ao uso das composições, conforme definidas acima, por serem empregadas na preparação de formulações medicamentosas; formulações químicas e formulações biopesticidas. Sendo que para formulação medicamentosa ter uso para tratar dor; inflamação; infecções bacterianas; infecções fúngicas. Para formulação biopesticida ter uso para controlar lagartas, carunchos e ácaros.

[0023] Notou-se surpreendentemente que as formulações ora pleiteadas apresentaram notável estabilidade em período de 1 ano (25°C), fato este comprovado por meio de ensaios de tamanho e distribuição de partículas, potencial Zeta e concentração de

nanopartículas.

Breve Descrição das Figuras

[0024] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, como se segue.

[0025] A Figura 1 ilustra o perfil cromatográfico de eugenol, empregando a técnica de UHPSFC.

[0026] A Figura 2 ilustra o perfil cromatográfico do óleo de cravo empregando a técnica de UHPSFC.

[0027] A Figura 3 ilustra o perfil cromatográfico de canela empregando a técnica de UHPSFC.

[0028] A Figura 4 ilustra o perfil cromatográfico da formulação F1 empregando a técnica de UHPSFC.

[0029] A Figura 5 ilustra o perfil cromatográfico da formulação F2 empregando a técnica de UHPSFC.

[0030] A Figura 6 ilustra o perfil cromatográfico da formulação F3 empregando a técnica de UHPSFC.

[0031] A Figura 7 ilustra o perfil cromatográfico de eugenol empregando a técnica de UHPLC.

[0032] A Figura 8 ilustra o perfil cromatográfico de óleo de cravo empregando a técnica de UHPLC.

[0033] A Figura 9 ilustra o perfil cromatográfico de óleo de canela empregando a técnica de UHPLC.

[0034] A Figura 10 ilustra o perfil cromatográfico da formulação F1 empregando a técnica de UHPLC.

[0035] A Figura 11 ilustra o perfil cromatográfico da formulação F2 empregando a técnica de UHPLC.

[0036] A Figura 12 ilustra o perfil cromatográfico

da formulação F3 empregando a técnica de UHPLC.

[0037] A Figura 13 ilustra a caracterização estrutural das formulações mediante a técnica de DSC.

[0038] A Figura 14 ilustra a caracterização estrutural das formulações mediante a técnica de FTIR-ATR.

[0039] A Figura 15 ilustra imagens de microscopia eletrônica de transmissão das diferentes formulações de NLC (F1, F2 e F3) em um aumento de 100.000x (acima) e 60.000x (abaixo).

[0040] A Figura 16 ilustra o efeito analgésico máximo possível em camundongos submetidos ao teste de *Tail Flick* após a administração de 100 µL das formulações F1, F2, F3 e do controle de solução salina de lidocaína 0,5%, n=5.

[0041] As Figuras 17 e 18 ilustram os esquemas utilizados nos ensaios *in vitro* para determinação da atividade antifúngica.

[0042] A Figura 19 ilustra a avaliação do crescimento fúngico após 24 e 48 h de cultivo estático, suplementado com extratos complexos.

[0043] A Figura 20 ilustra a avaliação do crescimento fúngico após 24 e 48 h de cultivo estático, suplementado com os insumos puros.

[0044] A Figura 21 ilustra a mortalidade de carunchos de feijão após a exposição de diferentes concentrações das formulações F1, F2 e F3.

[0045] A Figura 22 exhibe a porcentagem de mortalidade de ácaro rajado *Tetranychus urticae* com

formulações nanoestruturadas F1, F2 e F3, nas concentrações de 0,003, 0,03, 0,3 e 3,0% e do controle positivo (Propargite) e controle negativo (água desionizada) aos 4 dias após a transferência (4 DAA).

[0046] A Figura 23 exhibe a porcentagem de repelência de ácaro rajado *Tetranychus urticae* com formulações nanoestruturadas F1, F2 e F3, nas concentrações de 0,003, 0,03, 0,3 e 3,0% e do controle positivo (Propargite) e controle negativo (água desionizada) aos 4 dias após a transferência (4 DAA).

Descrição detalhada da invenção

[0047] A presente invenção se refere a formulações compreendendo carreadores lipídicos nanoestruturados.

[0048] Mais particularmente, ditas formulações abrangem diferentes lipídios naturais, tais como cera de abelha de 5 a 9% (m/v), preferivelmente 5%; manteigas de karité, cacau e palma de 10 a 20% (m/v), preferivelmente 10%, e óleos essenciais de cravo, canela, cravo-canela, pimenta preta e hortelã de 1 a 3% (m/v), preferivelmente 3%.

[0049] Já os biossurfactantes, podem ser escolhidos dentre o grupo compreendendo lauril glicosídeo (Plantaren 1200®) de 1 a 10% (m/v), preferivelmente 2%; decilpoliglicosídeo (Plantaren 2000®) de 1 a 10% (m/v), preferivelmente 2%, Dietanolamida do Ácido Graxo de coco (Amida 90®) de 1 a 5% (m/v), preferivelmente 1%; Monoetanolamina do Ácido Graxo de coco (Cocamide®), de 1 a 8% (m/v), preferivelmente 1%

e Olivato de Sorbitano da oliva (Oliva Mil®) de 3 a 10% (m/v), preferivelmente 3%.

[0050] A combinação de excipientes preferenciais para a presente invenção é selecionada do grupo que compreende:

i) manteiga de palma (10% m/v) + óleo essencial de cravo (3% m/v) e lauril glicosídeo (Plantaren 1200®) (2% m/v) - (F1);

ii) manteiga de palma (10% m/v) + óleo essencial de canela (3% m/v) e lauril glicosídeo (Plantaren 1200®) (2% m/v) - (F2);

iii) manteiga de palma (10%) + óleo essencial de cravo (1,5%) + óleo essencial de canela (1,5% m/v) e lauril glicosídeo (Plantaren 1200®) (2% m/v) - F3.

Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados

(NLC)

[0051] O preparo das diferentes formulações pode ser realizado pelo método da emulsificação-ultrasonicação ou homogeneização sob alta pressão. Em uma concretização preferencial, emprega-se a técnica de emulsificação-ultrasonicação nas condições a seguir.

[0052] Separam-se os componentes lipídicos e ambas as fases lipídicas são aquecidas em banho-maria, 10°C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido (manteiga de palma, TF 40°C). Simultaneamente, a fase aquosa foi composta pela solução do biossurfactante Plantaren 1200®, aquecida na mesma temperatura da fase lipídica. Para a formação da pré-emulsão, a fase aquosa foi gotejada à fase

lipídica, sob agitação de 10000 rpm, por 2 min, em agitador Ultra-Turrax (Ultra-turrax® T18). A pré-emulsão formada foi imediatamente submetida à sonicação por 15 minutos. Ao término desta etapa, a nanoemulsão gerada foi arrefecida em banho de gelo, até alcançar 25°C, a fim de solidificar as nanopartículas formadas. As formulações preparadas apresentaram coloração amarelo pálida, de aspecto líquido e homogêneo.

Ensaio de medidas de tamanho, dispersão das partículas, potencial Zeta e concentração de nanopartículas

[0053] As medidas de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta foram realizadas pela diluição das formulações (1:1000 v/v) em água desionizada. O equipamento de espalhamento dinâmico de luz usado foi o ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcester-shire, UK).

[0054] Os experimentos de rastreamento de nanopartículas (NTA) foram realizados no equipamento NanoSight NS300 (NanoSight - Malvern®, Reino Unido), que utiliza um vídeo-microscópio para analisar as propriedades de espalhamento de luz e o movimento browniano de partículas em suspensão, a fim de obter medidas de tamanho, concentração e agregação das mesmas, em amostras em suspensão líquida.

[0055] As medidas foram realizadas após diluição das amostras em água desionizada (1:50000 v/v) e injeção no interior do porta-amostra por meio de uma seringa esterilizada, até seu total preenchimento (~ 0,5 mL). A análise foi realizada com um feixe de laser verde ($\lambda=532$

nm), a 25°C, em triplicata.

[0056] Os resultados obtidos estão sumarizados de acordo com a **Tabela 1** a seguir:

Tabela 1. Caracterização estrutural das formulações de NLC naturais (F1, F2 e F3) no dia do preparo e após 1 ano.

FORMULAÇÃO	Tamanho (nm)		PDI		Zeta (mV)		[Np/mL]	
	Inicial	1 ano	Inicial	1 ano	Inicial	1 ano	Inicial	1 ano
F1	200	260	0.090	0.096	-44.9	-44.1	4.4E+13	4.1E+13
F2	202	232	0.058	0.047	-40.7	-42.3	4.7E+13	4.3E+13
F3	206	260	0.118	0.131	-49.5	-42.2	3.8E+13	3.3E+13

[0057] Os ensaios a seguir demonstram que os valores de tamanho de partícula, PDI, potencial Zeta e concentração de nanopartículas mantiveram-se estáveis após 1 ano de acompanhamento em temperatura ambiente, exibindo excelentes propriedades estruturais.

Obtenção do perfil cromatográfico dos óleos essenciais por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) e Cromatografia com Fluido Supercrítico de Ultra Alta Eficiência (UHPSFC)

[0058] Considerando as Figuras 1 a 12, a extração dos princípios ativos dos óleos essenciais de cravo e canela foi realizada com metanol. O eugenol foi utilizado como padrão por ser o composto majoritário presente em ambos os óleos essenciais de cravo e canela (folha), de acordo com o laudo do fabricante.

[0059] O perfil cromatográfico do eugenol (Figura 1), óleos essenciais de cravo (Figura 2) e canela (Figura 3) e das formulações F1 a F3 (Figuras 4 a 6, respectivamente) foram obtidos a partir das seguintes condições cromatográficas para a técnica de UHPSFC: coluna

cromatográfica Acquity HSS C18 1,7 μm 2,1 x 50 mm, vazão da fase móvel: 1,50 mL min⁻¹, temperatura do forno: 40°C, pressão de retorno: 1500 psi, volume de injeção: 0,5 μL , solvente de injeção: metanol, modo de eluição: 0,00-1,50 min: 100% CO₂, 1,50-2,50 min: gradiente 5%/min de metanol, 2,50 - 4,00 min: 95% CO₂: 5% metanol e detecção (PDA): 281,6 nm.

[0060] Para a técnica UHPLC as condições cromatográficas adotadas foram: coluna cromatográfica Acquity BEH C18 1,7 μm 2,1 x 50 mm, vazão da fase móvel: 0,3 mL min⁻¹, temperatura do forno: 30°C, temperatura amostrador: 30°C, volume de injeção: 2,0 μL , solvente de injeção: MeOH, Fase Móvel do solvente A 10 mM ácido fórmico em água e do solvente B 10 mM ácido fórmico em Acetonitrila, modo de eluição: 0,00-1,00 min: 5% de solvente B, 1,00- 7,00 min: gradiente 15%/min de solvente B, 7,00-8,00 min: 95% de solvente B e 8,00-10,00 min: 5% de solvente B e detecção (PDA): 281,6 nm.

[0061] O perfil cromatográfico obtido a partir de ensaios com UHPLC do eugenol, óleos essenciais de cravo, canela e formulações F1 a F3 estão representados nas Figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12 respectivamente.

[0062] Tais resultados confirmam que o princípio ativo (eugenol) presente nos óleos essenciais foi mantido após sua encapsulação pelas nanopartículas lipídicas. Isso demonstra que o método empregado, apesar de utilizar calor em seu procedimento, não foi responsável pela evaporação ou degradação do ativo na fórmula. Tais perfis cromatográficos

obtidos mediante distintas técnicas estão aptos a caracterizar analiticamente os novos compostos desenvolvidos.

Caracterização estrutural das formulações de NLC preparadas (FTIR-ATR, DSC e TEM)

[0063] Os espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR-ATR) foram obtidos mediante a técnica de transformada de Fourier. Os espectros foram registrados na região compreendida entre 4000 e 500 cm^{-1} . Esta técnica foi utilizada por permitir o estudo das possíveis interações entre os excipientes utilizados, proporcionando valiosas informações acerca da nova estrutura preparada.

[0064] As amostras foram analisadas por um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC), em um porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de + 0 a + 100 °C. As curvas de análise térmica são úteis para comprovar mudanças termodinâmicas das formulações em relação aos excipientes empregados.

[0065] As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss - LEO 906, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp. Para o preparo da amostra, uma gota da formulação será adicionada a uma grade de carbono. Após 10 s, o excesso da amostra foi retirado com papel de filtro e, em seguida, uma gota de solução aquosa de uranila a 2% (p/p) foi adicionada sobre a mesma, no

intuito de melhorar o contraste das imagens. Após cerca de 8 s, o líquido em excesso foi novamente retirado com papel de filtro e, na sequência, uma gota de água Milli-Q foi adicionada à grade, seguindo-se o mesmo procedimento para a retirada do excesso, após 5 s. Em seguida, a grade permaneceu em repouso, em temperatura ambiente, até a secagem das amostras.

[0066] Conforme observado na Figura 13 e Figura 14, as técnicas estruturais de caracterização confirmaram que as formulações desenvolvidas têm perfil compatível com sistemas de carreador lipídico nanoestruturado, mesmo sendo compostas somente por excipientes naturais, sem a indicação de decomposição ou degradação de qualquer um dos excipientes nas condições analisadas. Além disso, a Figura 15 referente à microscopia eletrônica de transmissão, ilustra a morfologia das diferentes formulações de NLC (F1, F2 e F3) em um aumento de 100.000x (acima) e 60.000x (abaixo), que confirmou o formato esférico de contornos bem delimitados, de dimensões semelhantes às quantificadas por DLS, de acordo com o esperado para este tipo de formulação. Assim, os lipídios estruturais escolhidos como matriz para a nanopartícula, os biossurfactantes empregados em sua estabilização e os óleos essenciais encapsulados como moléculas-ativas mostraram-se compatíveis entre si, sendo excelentes excipientes destas novas formulações com diversas atividades terapêuticas.

[0067] A seguir, serão descritos as metodologias e testes relacionados à capacidade antimicrobiana,

analgésica, antifúngica e biopesticida das composições ora pleiteadas.

Teste de suscetibilidade antimicrobiana

[0068] As formulações foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana dos compostos, determinada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se diferentes cepas bacterianas Gram-positivas (BEC 9393- *Staphylococcus aureus*, RIB1- *Staphylococcus aureus* MRSA, S. EP.- *Staphylococcus epidermidis*, e SAATCC- *Staphylococcus aureus* ATCC 25922) e Gram-negativas (31 NM- *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica e KP 230- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25619).

[0069] As placas contendo ágar Mueller Hinton preparadas antecipadamente foram retiradas da geladeira e armazenadas até atingir a temperatura ambiente. Foram feitos poços de 12 mm de diâmetro. Com um swab estéril, o inóculo bacteriano com turvação 0,5 da escala de MacFarland foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, deixados em repouso em temperatura ambiente, por aproximadamente 5 minutos. As placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. O halo de inibição do crescimento foi medido por meio de régua milimetrada. Os testes foram realizados em duplicata e em dias diferentes. O álcool etílico hidratado 96° foi empregado como controle negativo e a solução do antibiótico ciprofloxacino (CPR) foi utilizado como controle positivo.

[0070] De acordo com a Tabela 2, fica evidente a atividade bactericida de cada formulação (F1, F2 e F3) em

relação aos distintos tipos de cepas bacterianas testadas, em comparação com o controle positivo do antibiótico. As formulações compostas por lipídios naturais apresentaram um efeito antimicrobiano semelhante ou maior que o antibiótico empregado como controle positivo, como é o caso da cepa bacteriana BEC. E ainda, as formulações foram eficazes contra a cepa KP230 (Gram -), onde o antibiótico CPR não teve efeito terapêutico sobre a mesma. Cabe ressaltar, que formulações de NLC com maiores concentrações de óleos essenciais poderão ser preparadas com sucesso e seu efeito bactericida poderá ser igualmente avaliado.

Tabela 2. Susceptibilidade bacteriana de diferentes cepas tratadas com as formulações naturais F1, F2 e F3, e com o controle positivo do antibiótico ciprofloxacino (CPR).

Cepa	Gram	F1	F2	F3	CPR
BEC	+	1,6 cm	1,6 cm	1,6 cm	1,0 cm
RIB 1	+	1,4 cm	1,3 cm	1,2 cm	3,8 cm
S. EP	+	1,4 cm	1,3 cm	1,5 cm	4,7 cm
31 MN	-	-	1,3 cm	-	5,4 cm
SAATCC	+	2,0 cm	2,2 cm	2,1 cm	2,6 cm
KP230	-	1,1 cm	1,1 cm	1,1 cm	-

Estudo in vivo da eficiência anestésica por Tail-flick

[0071] A avaliação da atividade analgésica (bloqueio sensorial) das formulações de NLC natural F1, F2 e F3 foi realizada em camundongos *Swiss* machos (30-35 g). Os animais foram alojados nas seguintes condições: 25°C ± 2°C, 30% -70% de umidade e 12/12 h de ciclo claro/escuro, com comida e água disponíveis *ad libitum* e separados em grupos de 5 animais.

[0072] Primeiramente, os animais foram anestesiados

com volume máximo de 100 µL da formulação ou de solução de cloridrato de lidocaína 0,5% como controle. As amostras foram aplicadas por via intradérmica na base da cauda do animal. As medidas foram realizadas no equipamento de *tail-flick* (Onda Científica Ltda). A base da cauda foi colocada sob estímulo térmico (~55°C) por um tempo de latência de 10 segundos (*cutoff*), até a reação de movimentação da cauda. O animal foi submetido a esse procedimento em tempos de 30 min e 1 hora, e a partir disso, a cada hora até que o tempo de latência atinja o valor da linha basal. Todos os experimentos foram realizados pelo mesmo observador.

[0073] A **Figura 14** ilustra os resultados obtidos e expressos em percentagem de efeito máximo possível (%EMP) e os resultados tratados com o software GraphPad Prism® 6.0. Todas as análises foram realizadas no Instituto de Biologia da Unicamp, de acordo com as normas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB-Unicamp) aprovado pelo comitê de ética (4833-1/2018).

[0074] Tais resultados demonstraram que o efeito das formulações testadas (F1, F2 e F3) não apresentaram diferença estatística (AUC) em relação ao fármaco controle - lidocaína 0,5% em salina - após administração via intradérmica na base da cauda de camundongos. As formulações testadas também se comportaram de maneira similar ao controle mesmo em relação ao tempo de recuperação do bloqueio sensorial, reforçando assim a similaridade de ação dessas formulações de NLC naturais com o fármaco de ação

anestésica reconhecida (lidocaína).

Tabela 3. Dados de área sobre a curva (AUC) e tempo de recuperação dos camundongos submetidos ao teste de *Tail Flick* em relação a cada grupo testado.

Formulação	AUC (0-6h)	T _{rec} (h)
LID 0,5%	243,8±22,03	2 (1,5- 3)
F1	297,6±29,19	2 (1,5- 3)
F2	306,4±67,15	2 (1,5- 3)
F3	280,1±35,42	2 (1,5- 3)

Avaliação in vitro da atividade fungicida

[0075] A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada frente aos seguintes microrganismos: *Aspergillus fumigatus*, *Cândida albicans* e *Trichophyton rubrum*. Os fungos foram mantidos e repicados em meio *potato dextrose agar* (PDA; Sigma-Aldrich). Após o repique em meio sólido, as culturas foram incubadas em estufa a 35 °C, por 24 h, 96 h e até esporulação, respectivamente em *C. albicans*, *T. rubrum* e *A. fumigatus*. Devido a não produção de esporos, os ensaios de *T. rubrum* foram padronizados discos 4 mm de diâmetro nos inóculos em meio sólido.

[0076] Para os testes de atividade antifúngica, foram utilizadas 3 diferentes formulações classificadas como E1 (F1), E2 (F2) e E3 (F3). Essas três formulações, são extratos solúveis em água e foram utilizados diretamente no ensaio, e também foram analisadas com seus insumos separadamente que foram classificadas de I1 a I5.

[0077] A avaliação da atividade antifúngica dos insumos puros foi desenvolvida de acordo com os parâmetros determinados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) em microplaca estéril de 96 poços. Dessa forma

utilizou-se o meio de cultivo sintético RPMI-1640 tamponado em pH 7,0 com 0,165 mol/L de MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico) a fim de não antagonizar com os agentes antifúngicos.

[0078] Os extratos foram analisados em 12 concentrações diferentes, diluídas em série de 1:1 em solução salina (NaCl 0,85%), iniciando 0,3% de E1 a E3 de acordo com a Figura 17. Os insumos foram analisados em duplicata em 6 concentrações diferentes, diluídas em série de 1:1 em solução salina (NaCl 0,85%), iniciando em 1% do insumo I1; 0,5% do insumo I2; e 0,3% dos insumos I3 a I5 de acordo com a Figura 18.

[0079] Os microrganismos foram contados utilizando câmara de Neubauer e inoculados na concentração final de 10³ e 10⁴ unidades por/ml de *C. albicans* e *A. fumigatus*, respectivamente. Todas as placas de microdiluição foram incubadas a 35°C sem agitação.

[0080] Na última linha da segunda placa foram adicionados 3 diferentes controles em duplicatas. O controle negativo, somente com o meio RPMI-1640; controle positivo, contendo o meio RPMI e o inóculo; e o controle positivo contendo 1% de DMSO.

[0081] Na penúltima linha da placa foram adicionadas 4 réplicas de controles positivos, contendo o meio RPMI e o inóculo. Todas as análises foram realizadas em duplicata (1-6 e 7-12).

[0082] No teste convencional de microdiluição, o crescimento em cada poço recebeu um escore numérico, da

seguinte maneira: 4 = nenhuma redução do crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento ou aproximadamente 75% do crescimento do controle (meio isento de droga); 2 = redução proeminente de crescimento ou aproximadamente 50% do crescimento do controle; 1 = ligeiro crescimento ou aproximadamente 25% do crescimento do controle; e 0 = opticamente claro ou ausência de crescimento.

[0083] Nas presentes análises classificaram-se alguns poços com o valor 5, pois nessa determinada condição o microrganismo apresentou crescimento maior do que o controle positivo. A menor concentração de um agente antifúngico que inibe substancialmente o crescimento do organismo visualmente detectado é denominado CIM (concentração inibitória mínima). Assim, para a determinação do CIM avaliou-se o crescimento dos cultivos após 24 e 48 horas, conforme representado a seguir nas Figuras 19 e 20.

[0084] A atividade antifúngica dos extratos em *C. albicans* foi verificada para os extratos E1 a E3. Em relação a atividade antifúngica em *A. fumigatus*, o crescimento foi completamente inibido utilizando os extratos E1 a E3. Dessa forma, os valores de CIM foram obtidos para os três extratos complexos (Tabela 3). Por convenção os valores de análise da inibição variam de 0 a 4, no entanto classificamos algumas condições com o escore numérico de 5.

[0085] Esses valores foram observados no cultivo de *C. albicans* no extrato E2. Esse aumento no crescimento se

deve a uma possível suplementação do meio de cultivo favorecendo o crescimento do microrganismo, uma vez que os extratos são complexos e podem conferir uma vantagem nutricional nessas determinadas condições.

Tabela 3. Resumo das atividades antifúngicas após 48 h.

Formulação		CIM	CIM
		<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>
E1	F1	0,0188%	0,0094%
E2	F2	0,0188%	0,0047%
E3	F3	0,0188%	0,0047%

[0086] A atividade antifúngica em *C. albicans* foi verificada apenas para os insumos I2, em todas as concentrações avaliadas. Enquanto que I4, I5 e I3 apresentaram, respectivamente, uma inibição de aproximadamente 75%, 50% e 25% do crescimento. Em relação a atividade antifúngica em *A. fumigatus*, foi verificada a inibição de crescimento apenas para os insumos I2, em todas as concentrações testadas, e I4 na concentração de 0,30%.

[0087] A inibição do crescimento em 75% e 50%, respectivamente, foi observada em I5 e I3. Em ambos os fungos o insumo I1 não promoveu nenhuma alteração no crescimento dentre as concentrações testadas. Dessa forma, os valores de CIM foi determinado somente em I4 na concentração de 0,30% para *A. fumigatus*.

[0088] Apesar de observar a inibição de crescimento de ambos os fungos em todas as concentrações de I2 não se

atingiu uma diluição que permitisse o crescimento fúngico. Dessa forma podem-se dizer que o CIM do I2 é menor do que a menor concentração testada.

[0089] A Tabela 4 sumariza as atividades antifúngicas após 48 horas:

Tabela 4. Resumo das atividades antifúngicas após 48

h.

Insumos		CIM <i>C. albicans</i>	Cim <i>A. fumigatus</i>
I1	Lipídio sólido	Não	Não
I2	Surfactante	< 0,02%	< 0,02%
I3	ativo F1	Não	Não
I4	ativo F2	Não	Não
I5	ativo F3	Não	0,30%

[0090] Posteriormente aos cultivos de 48 h, 100 µl do volume dos poços que apresentaram CIM definido foram inoculados em PDA a 35 °C a fim de verificar se o extrato tem atividade fungicida ou fungistática. De acordo com os dados obtidos, pode-se inferir que os insumos I2 e I4 tem atividade fungistática, visto que foi detectado o

crescimento de *A. fumigatus* e *C. albicans* após o inóculo em meio sólido.

[0091] Para os testes de atividade antifúngica em meio sólido em placa de Petri utilizou-se 10 ml de meio PDA suplementado com 0,30% de extrato complexo. Nesse teste os ensaios foram realizados em duplicata de cada extrato complexo adicionado de uma duplicata controle contendo somente PDA.

[0092] A avaliação do crescimento foi realizada diariamente por um período de 10 dias a partir do inóculo para os fungos *A. fumigatus*, *C. albicans* e *T. rubrum*.

[0093] A partir do primeiro dia já foi possível observar o crescimento de todos os fungos no cultivo controle. Após os 10 dias de acompanhamento não foi possível observar o crescimento de nenhum fungo em todos os extratos complexos. Dessa forma, infere-se que existe uma sinergia entre os insumos que permite a inibição do crescimento em períodos maiores em comparação aos insumos puros.

[0094] Dentre os extratos analisados foi possível determinar a CIM dos extratos E1, E2 e E3 tanto em *C. albicans* quanto em *A. fumigatus*. Quanto aos insumos analisados foi observado a inibição de crescimento em I2 e I5, no entanto só possível determinar a CIM exata de I5 para *A. fumigatus*. Apesar de não inibir completamente o crescimento do *A. fumigatus* os insumos I3 e I5 inibiram em pelo menos 50% o crescimento esperado.

[0095] Dessa forma, de acordo com a viabilidade,

pode-se atingir a inibição do crescimento em concentrações maiores às testas nesse ensaio. Quanto a inibição do crescimento de *C. albicans*, pode-se inferir que I3, I4 e I5 apresentam potencial inibição de crescimento, porém em concentrações maiores do que as testadas nesse ensaio. Além disso, foi observado que o insumo I2 tem atividade fungistática em *A. fumigatus* e *C. albicans*; e I4 tem atividade fungistática em *A. fumigatus*. Apesar dos resultados obtidos com os insumos purificados, o ensaio em meio sólido mostrou que os extratos complexos têm maior eficiência e são capazes de inibir o crescimento de *A. fumigatus*, *C. albicans* e *T. rubrum* em períodos de até 10 dias.

Avaliação da atividade lagartícida das formulações

[0096] Para cada espécie foram utilizadas 50 lagartas em cada tratamento, distribuídas em 10 potes plásticos (7,0 x 3 cm). Em cada recipiente foi colocado 19,2 cm³ de dieta artificial, sobre a qual foi aplicado 200 microlitros da suspensão contendo os tratamentos. Após a secagem do excesso de água foram transferidas lagartas de segundo instar de cada espécie. A mortalidade foi anotada sete dias após os tratamentos. Na testemunha foi aplicada água destilada. A lagarta foi considerada morta quando não apresentava movimentos quando tocada com pincel de cerdas finas.

[0097] A maior mortalidade obtida foi para o tratamento F2 para *S. frugiperda* (56%) e em seguida com o

tratamento F3 (42%) para *C. includens*. Para os demais tratamentos a mortalidade foi inferior, com redução ou estabilidade da mortalidade em função da redução da concentração testada. Na testemunha a mortalidade foi zero para todos os tratamentos. A diferença de suscetibilidade entre as espécies era esperada, uma vez que ambas apresentam a mesma variação de resposta a inseticidas convencionais e bioinseticidas.

[0098] Os ensaios a seguir ilustram a mortalidade de diferentes espécies frente as formulações F1-F3 sob diferentes diluições.

a) Mortalidade de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) frente ao tratamento F3

1 Diluição (0,3%)

POTES 1 a 10

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	2	2	3	1	2	0	1	2	5	3	21 (42%)

2 Diluição (0,03%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	1	2	1	3	2	0	1	0	1	2	13 (26%)

3 Diluição (0,003%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	1	1	3	2	1	0	1	1	3	2	15 (30%)

b) Mortalidade de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) com Tratamento F2.

1 Diluição (0,3%)

Dia de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-------

avaliação												
Número mortos	0	1	1	0	2	2	0	1	0	3	10	(20%)

2 Diluição (0,03%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	
Número mortos	4	0	2	1	0	2	2	0	0	0	11	(22%)

3 Diluição (0,003%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	
Número mortos	0	0	2	0	2	3	1	1	1	1	11	(22%)

c) Mortalidade de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera:

Noctuidae): Tratamento F1

1 Diluição (0,3%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	
Número mortos	2	1	3	1	3	2	0	2	1	2	17	(34%)

2 Diluição (0,03%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	
Número mortos	2	1	0	1	2	0	0	0	3	2	11	(22%)

3 Diluição (0,003%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	
Número mortos	1	0	2	0	0	0	0	2	1	0	6	(12%)

d) Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

Noctuidae): Tratamento F3

POTES 1 a 10

1 Diluição (0,3%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	
Número mortos	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	(4%)

2 Diluição (0,03%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	0	1	0	1	1	0	0	2	0	1	6 (12%)

3 Diluição (0,003%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	0	0	3	1	0	0	0	2	0	0	5 (10%)

e) Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

Noctuidae): Tratamento F2

1 Diluição (0,3%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	4	4	4	3	3	2	1	1	3	3	28 (56%)

2 Diluição (0,03%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	2	2	0	1	1	1	3	1	2	1	14 (28%)

3 Diluição (0,003%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	0	0	3	1	0	2	1	1	1	0	9 (18%)

f) Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

Noctuidae): Tratamento F1

1 Diluição (0,3%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	3	1	2	3	0	2	1	2	2	5	20 (40%)

2 Diluição (0,03%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	5	2	3	0	2	1	0	0	1	1	15 (30%)

3 Diluição (0,003%)

Dia de avaliação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Número mortos	0	1	5	1	0	0	0	0	0	0	7 (14%)

Avaliação da mortalidade de carunchos de feijão

[0099] A cultura de *Acanthoscelides obtectus* utilizada foi obtida e estabilizada no Laboratório de Biologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - Campus Sorocaba, São Paulo, Brasil. Os insetos foram mantidos em bandejas, com aeração, em incubadora e condições de ausência de luz, temperatura de 27 ± 2 °C, com umidade máxima de 73% e mínima de 52%.

[00100] O feijão carioca (Qualitá®), adquirido em supermercado comum local utilizado para manutenção da cultura e realização dos experimentos foi previamente mantido em freezer durante 14 dias e seco visando evitar possível infestação vinda do campo e reduzir qualquer efeito potencial por resíduo de inseticida.

[00101] Em frascos plásticos de 145 mL com pequenos furos na tampa para aeração, foi adicionado 25 g de feijão carioca, aplicado os tratamentos de F1, F2, F3, F1C, F2C e F3C e os frascos foram agitados manualmente por 60 segundos visando garantir distribuição completa do material nos grãos de feijão. Dez *A. obtectus* de 1 a 5 dias de idade não sexados foram colocados em cada um deles, e os frascos foram mantidos sob condições laboratoriais controladas (ausência de luz, temperatura de 27 ± 2 °C, umidade de 52% a 73%) durante 96 horas. O experimento foi realizado nas

concentrações de 8.13, 16.25, 32.5, 65 e 130 uL do ativo/kg do feijão.

[00102] A mortalidade foi avaliada após o período de exposição, em estereoscópio Coleman® XTB-2B e os besouros foram considerados mortos quando não apresentavam movimentos mesmo estimulados por toque de pincel com cerdas finas durante 30 segundos. Duas repetições foram realizadas para cada dose e para o tratamento controle e o experimento repetido por três vezes.

[00103] De acordo com o demonstrado na **Figura 21**, pode-se evidenciar que todas as formulações foram responsáveis pela mortalidade dos carunchos em porcentagens igual ou superior a 50%, nas 5 concentrações testadas.

Avaliação in vivo da Atividade acaricida

[00104] Os ácaros *Tetranychus urticae* utilizados no experimento foram procedentes de uma criação mantida sobre plantas de feijão-de-porco *Canavalia ensiformes* (L.) DC cultivadas em vasos de 2 L de capacidade, contendo solo, areia e esterco bovino (1:1:1) como substrato. A criação estava mantida em câmara climatizada (temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas).

[00105] No experimento foram utilizadas arenas confeccionadas de folhas da planta hospedeira (*C. ensiformis*) de 2,5 cm de diâmetro. As arenas foram colocadas em placas de Petri de 9 x 2 cm contendo espuma umedecida e as arenas foram circundadas com algodão hidrófilo.

[00106] Foram avaliados 14 tratamentos estabelecidos

na Tabela 5. Cada tratamento foi repetido 8 vezes e cada repetição foi composta por uma arena. As aplicações dos produtos foram realizadas sob torre de Potter calibrada a 4 lbf.pol-2. Foram aplicados 2 mL de calda por disco, correspondendo a $1,56 \text{ mg cm}^{-2}$ de resíduo seco. Após a secagem dos produtos sobre as folhas (aproximadamente 2 horas) foram transferidos com pincel de um pelo, cerca de 10 ácaros fêmeas adultas de *T. urticae* para cada arena, totalizando 80 ácaros por tratamento. Após as transferências as arenas foliares foram levados para câmara climatizada com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. As avaliações para quantificação dos ácaros mortos, vivos e retidos na barreira de algodão foram realizadas aos 1, 2, 3 e 4 dias após a transferência (DAA) dos ácaros.

Forma de análise dos dados:

[00107] Foi calculada a porcentagem de mortalidade de ácaros e a porcentagem de repelência de ácaros.

[00108] Com base nas Figuras 22 e 23, evidenciou-se que as formulações testadas apresentaram atividade acaricida semelhante ao controle positivo, em todos os casos. Além disso, elas mostraram-se excelentes repelentes contra os ácaros, sendo superior ao controle positivo mesmo quando diluídas, em todos os casos.

Tabela 5. Descrição dos tratamentos a serem utilizados no experimento.

Tratamentos	Produtos	Concentração % de ativo
1	F1	0,003

2	F1	0,03
3	F1	0,3
4	F1	3,0
5	F2	0,003
6	F2	0,03
7	F2	0,3
8	F2	3,0
9	F3	0,003
10	F3	0,03
11	F3	0,3
12	F3	3,0
13	Propargite _ controle positivo	1 mL / L ⁻¹
14	Água desionizada _ controle negativo	-

[00109] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de carreadores lipídicos nanoestruturados, **caracterizada** por compreender:

- carreadores lipídicos nanoestruturados estritamente naturais selecionados do grupo que compreende cera de abelha; manteigas de karité; cacau e palma; ou combinação das mesmas;

- óleos essenciais; e

- biossurfactantes.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender:

- de 5 a 20% (m/v) de carreadores lipídicos nanoestruturados estritamente naturais selecionados do grupo que compreende cera de abelha; manteigas de karité; cacau e palma; ou combinação das mesmas;

- de 1 a 3% (m/v) de óleos essenciais; e

- de 1 a 10 % (m/v) de biossurfactantes.

3. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizada** pelo fato da cera de abelha estar presente em uma quantidade de 5 a 9% (m/v).

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizada** pelo fato das manteigas de karité estarem em uma quantidade de 10 a 20% (m/v).

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizada** pelo fato do cacau estar em uma quantidade de 10 a 20% (m/v).

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizada** pelo fato do óleo de

palma estar em uma quantidade de 10 a 20% (m/v).

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizada** pelo fato dos óleos essenciais serem selecionados do grupo compreendendo cravo; canela; cravo-canela; pimenta preta; hortelã ou combinações das mesmas.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizada** pelos biossurfactantes serem naturais e selecionados do grupo compreendido por lauril glicosídeo; decilpoliglicosídeo; derivado de óleo de coco; emulsionantes derivados de oliva ou combinações das mesmas.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de lauril glicosídeo estar presente em uma quantidade de 1 a 10% (m/v).

10. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de decilpoliglicosídeo estar presente em quantidade de 1 a 10% (m/v).

11. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato dos derivados de óleo de coco compreender Dietanolamida do Ácido Graxo de coco com 90% (Amida 90[®]) mínimo de concentração em uma quantidade de 1 a 5% (m/v) e monoetanolamina cocamida estar presente em uma quantidade de 1 a 8% (m/v).

12. Composição, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato do emulsionante derivado de oliva estar presente em uma quantidade de 3% a 10% (m/v).

13. Composição de acordo com a reivindicação 12,

caracterizada por o emulsionante derivado de oliva ser Olivato de sorbitano.

14. Composição de carreadores lipídicos nanoestruturados, **caracterizada** por compreender 10% m/v de manteiga de palma; 3% m/v de óleo essencial de cravo; e 2% m/v de lauril glicosídeo - (F1).

15. Composição de carreadores lipídicos nanoestruturados, **caracterizada** por compreender 10% m/v de manteiga de palma; 3% m/v de óleo essencial de canela e 2% m/v de lauril glicosídeo - (F2).

16. Composição de carreadores lipídicos nanoestruturados, **caracterizada** por compreender 10% m/v de manteiga de palma; 1,5% m/v de óleo essencial de canela; 1,5% m/v de óleo essencial de cravo; 2% m/v de lauril glicosídeo - (F3).

17. Uso das composições, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **caracterizada** por ser empregada na preparação de formulações medicamentosas; formulações químicas e formulações biopesticidas.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** por a formulação medicamentosa ser para tratar dor; inflamação; infecções bacterianas; infecções fúngicas.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** por a formulação biopesticida ser para controlar lagartas, carunchos e ácaros.

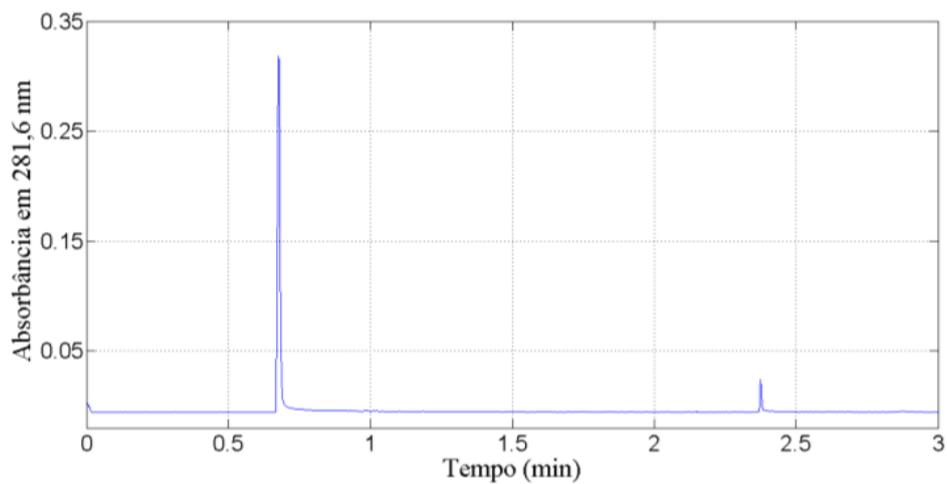


Figura 1

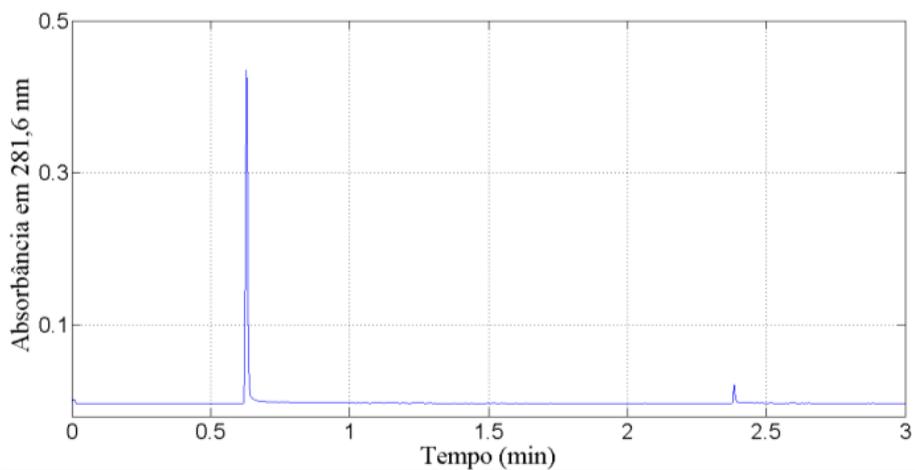


Figura 2

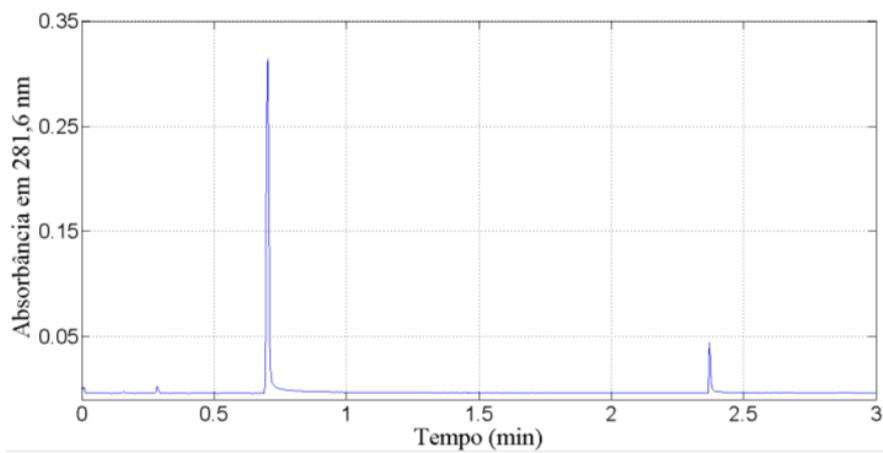


Figura 3

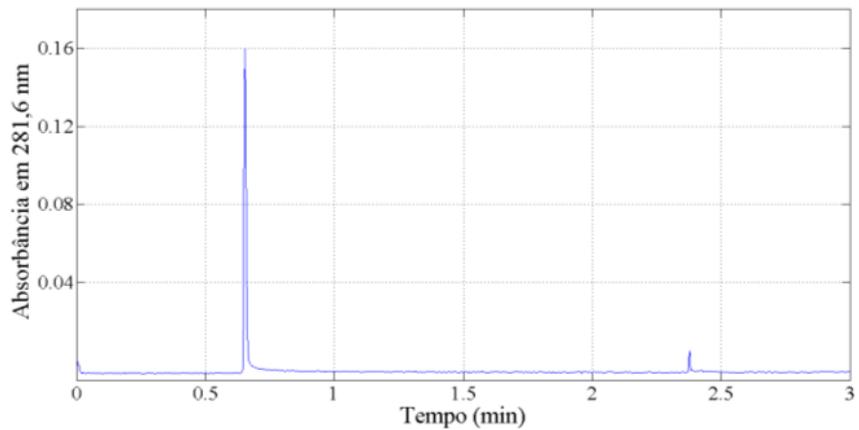


Figura 4

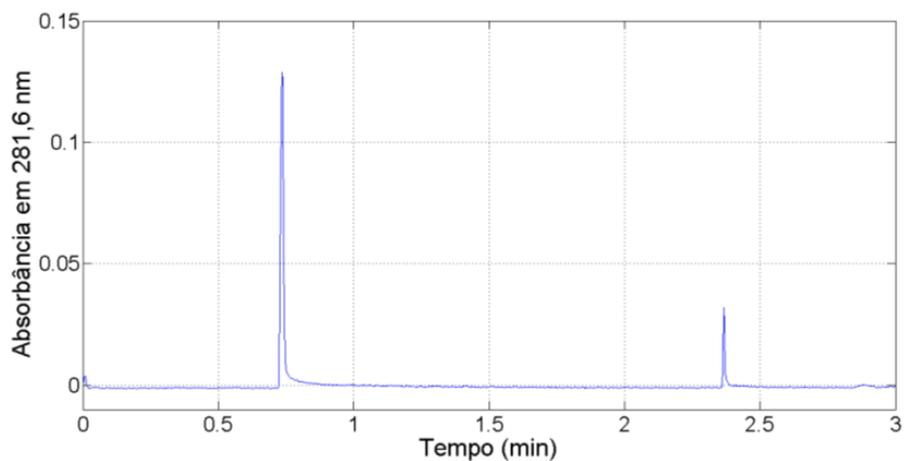


Figura 5

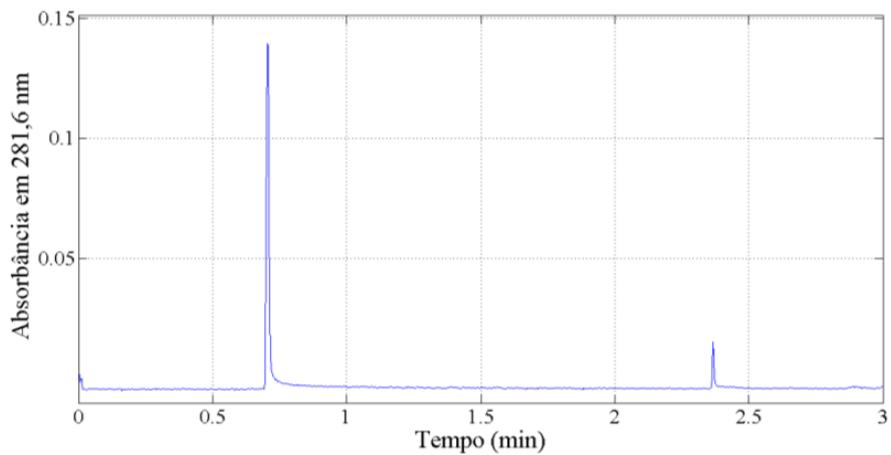


Figura 6

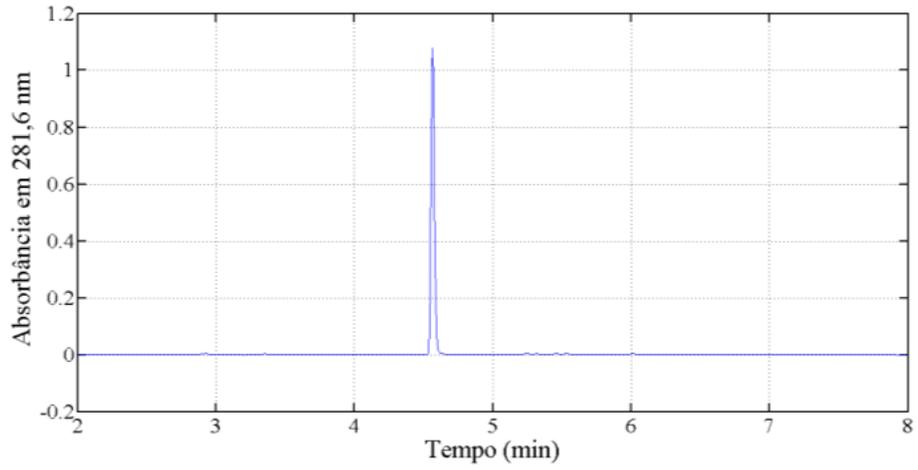


Figura 7

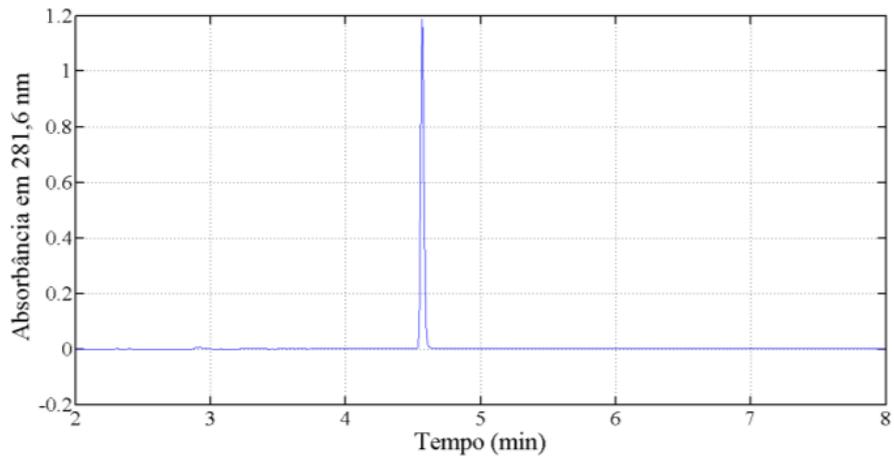


Figura 8

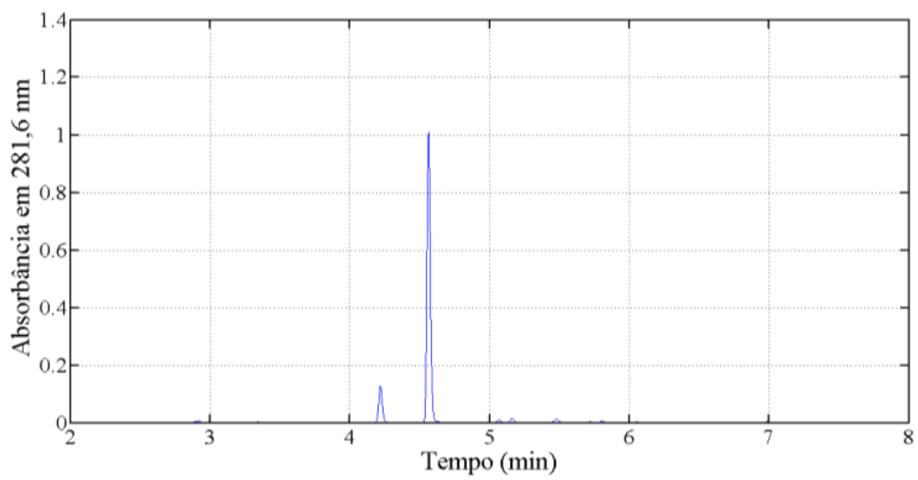


Figura 9

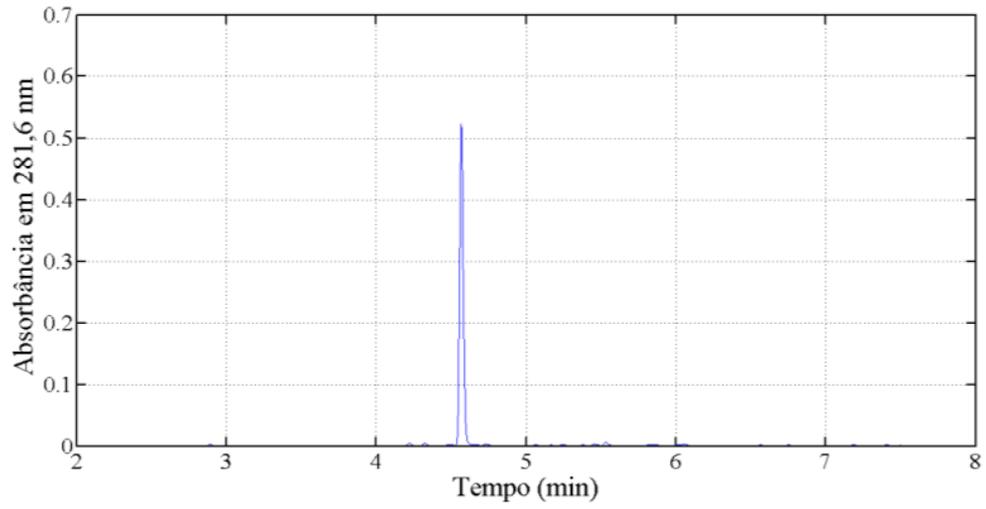


Figura 10

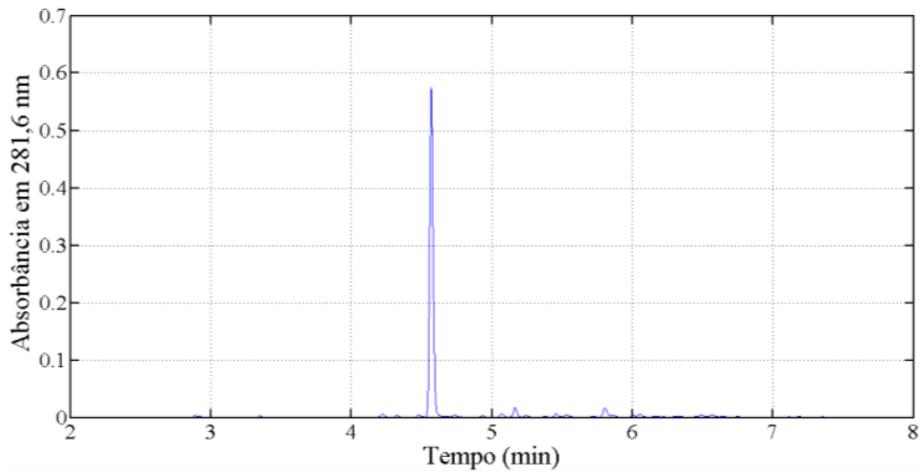


Figura 11

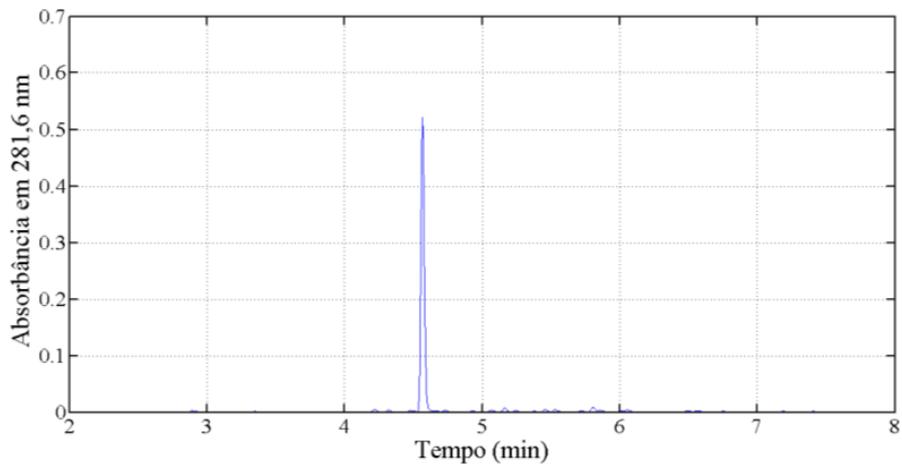


Figura 12

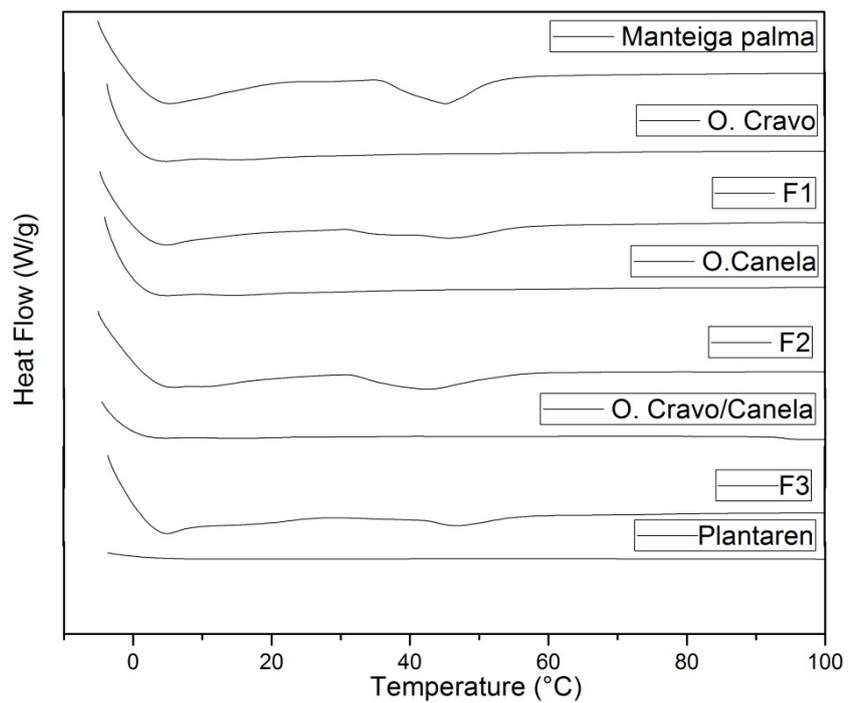


Figura 13

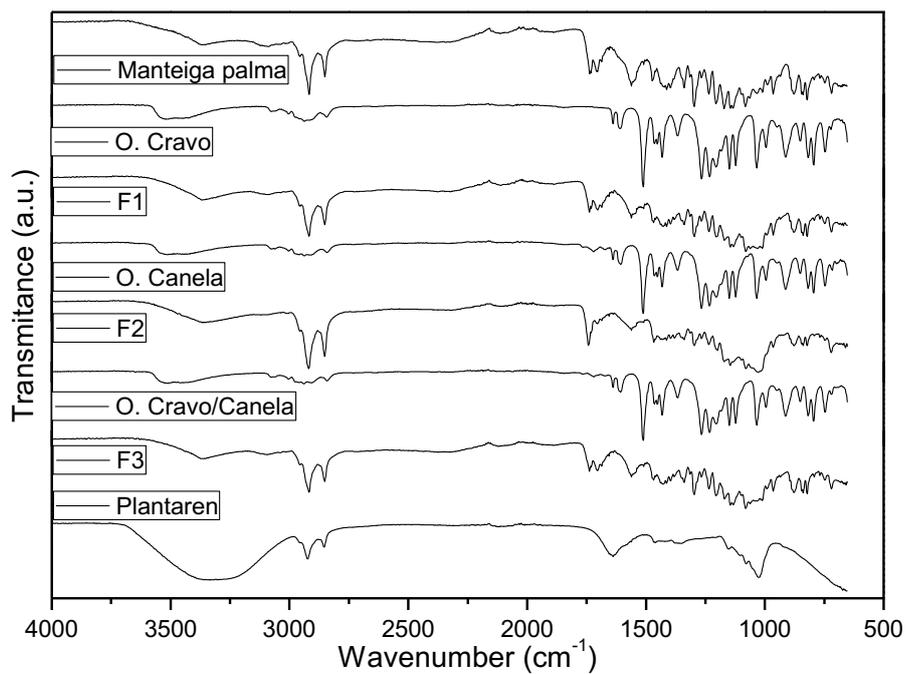


Figura 14

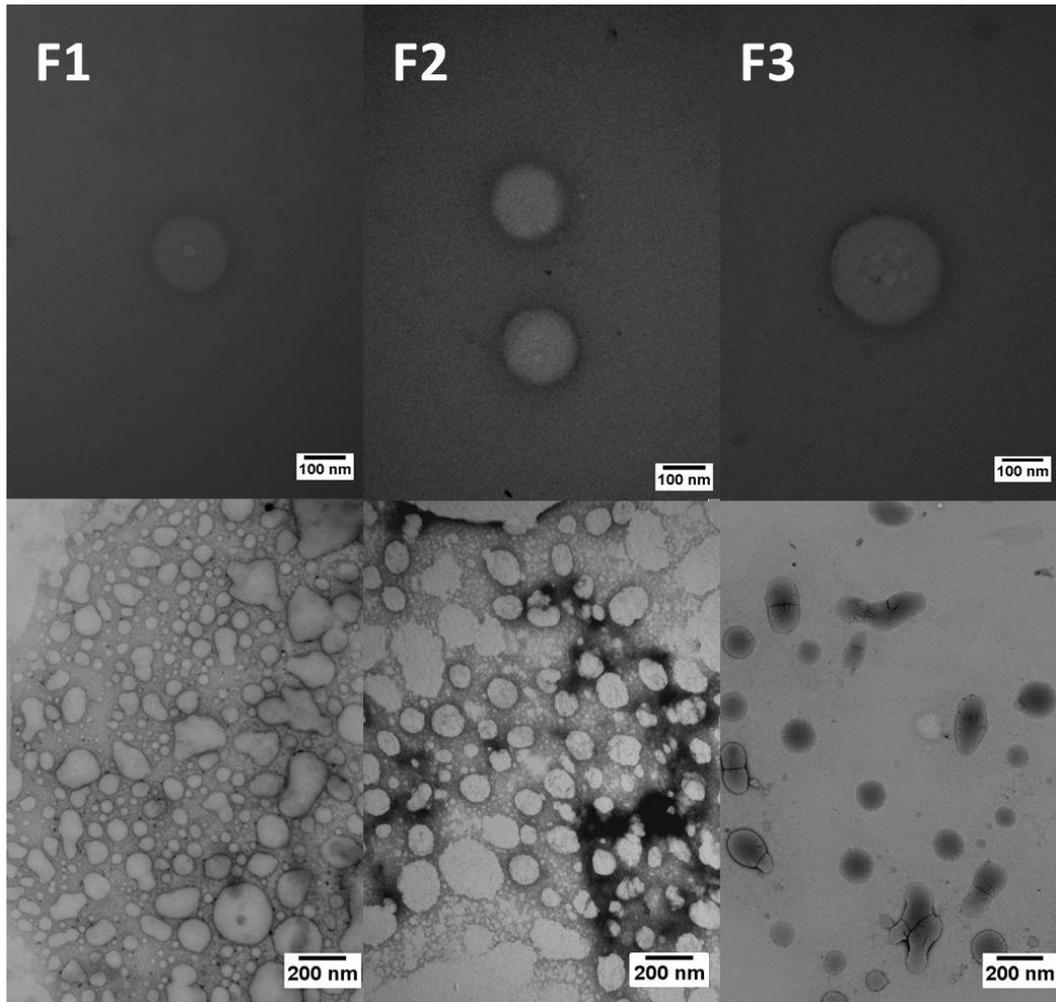


Figura 15

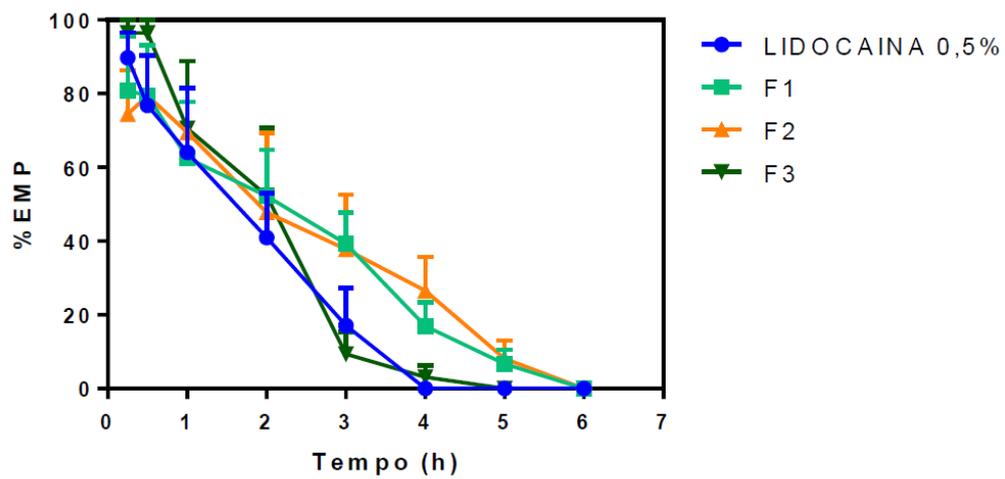


Figura 16

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
													A
													B
													C
E1	0,30%	0,1500%	0,0750%	0,0375%	0,0188%	0,0094%	0,0047%	0,0023%	0,0012%	0,0006%	0,0003%	0,0001%	D
E2	0,30%	0,1500%	0,0750%	0,0375%	0,0188%	0,0094%	0,0047%	0,0023%	0,0012%	0,0006%	0,0003%	0,0001%	E
E3	0,30%	0,1500%	0,0750%	0,0375%	0,0188%	0,0094%	0,0047%	0,0023%	0,0012%	0,0006%	0,0003%	0,0001%	F
	Rpmi	Rpmi	Rpmi + fungo	Rpmi + fungo	Rpmi + fungo + 1% DMSO	Rpmi + fungo + 1% DMSO							G
													H

Figura 17

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
I1	1,00%	0,50%	0,25%	0,13%	0,06%	0,03%	1,00%	0,50%	0,25%	0,13%	0,06%	0,03%	A
I2	0,50%	0,25%	0,13%	0,06%	0,03%	0,02%	0,50%	0,25%	0,13%	0,06%	0,03%	0,02%	B
I3	0,30%	0,15%	0,08%	0,04%	0,02%	0,01%	0,30%	0,15%	0,08%	0,04%	0,02%	0,01%	C
I4	0,30%	0,15%	0,08%	0,04%	0,02%	0,01%	0,30%	0,15%	0,08%	0,04%	0,02%	0,01%	D
I5	0,30%	0,15%	0,08%	0,04%	0,02%	0,01%	0,30%	0,15%	0,08%	0,04%	0,02%	0,01%	E
													F
	Control e positivo	Control e positivo					Control e positivo	Control e positivo					G
													H

Figura 18

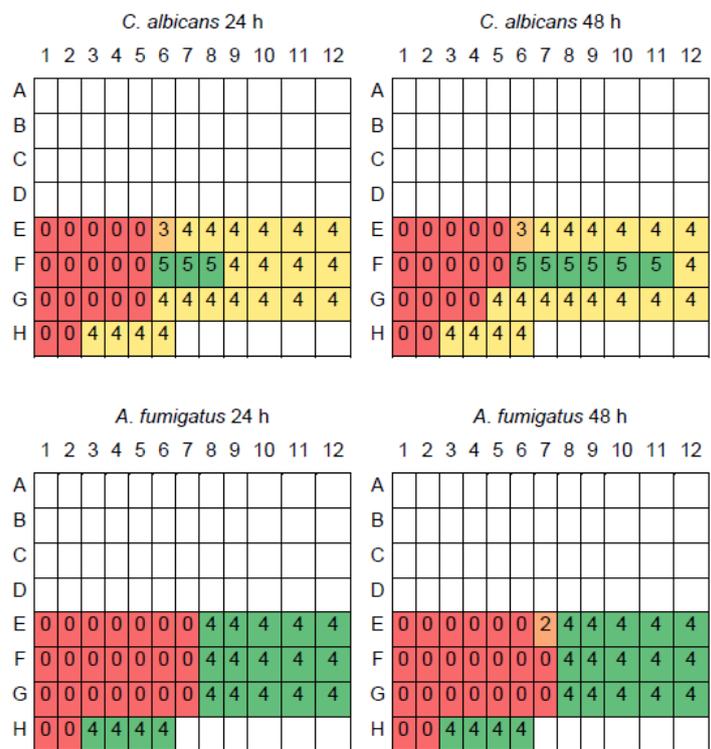


Figura 19

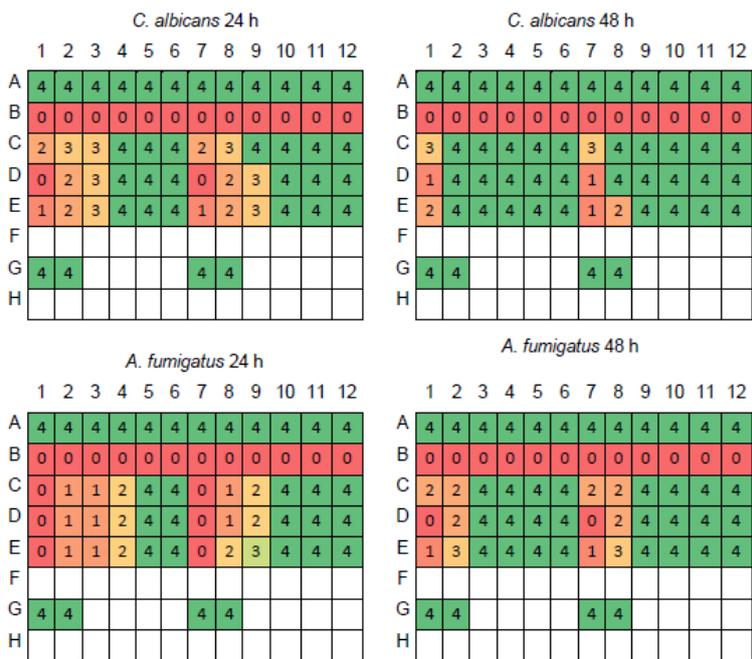


Figura 20

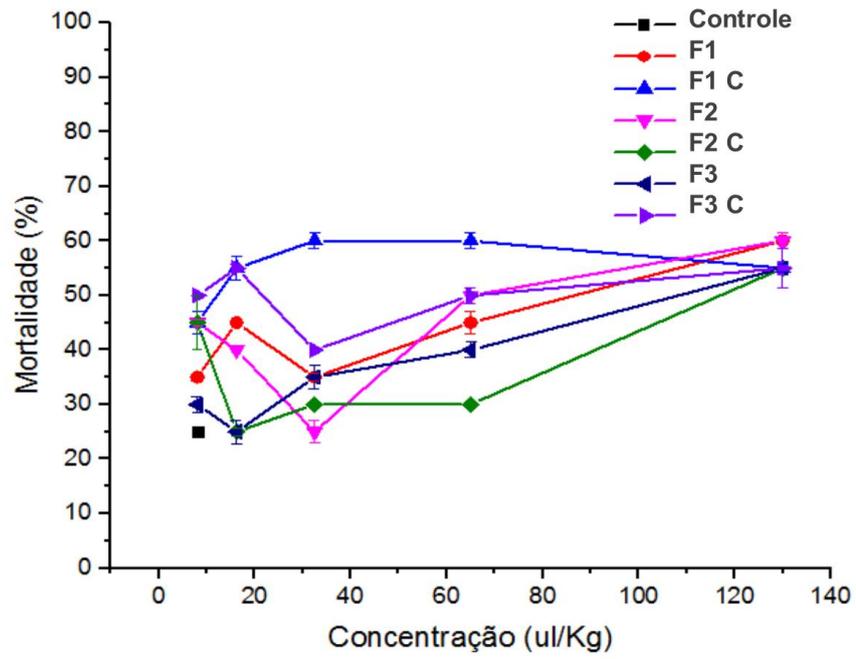
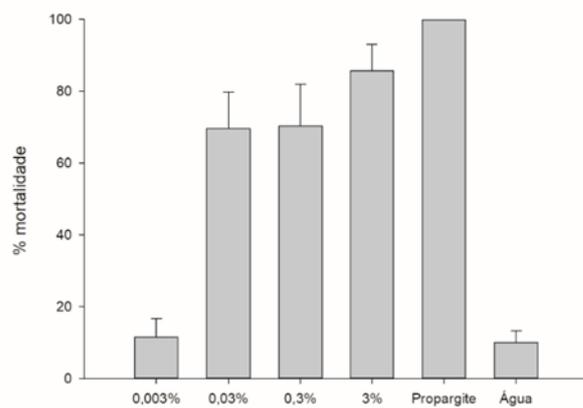
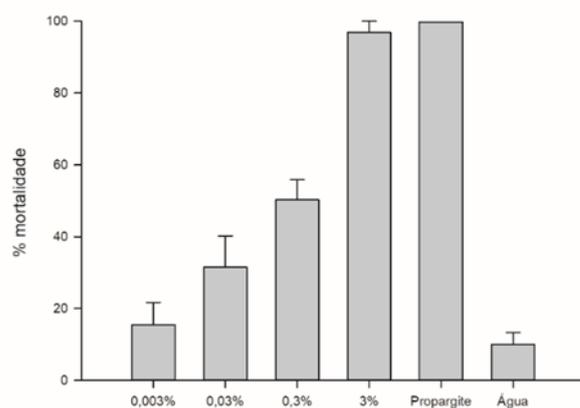


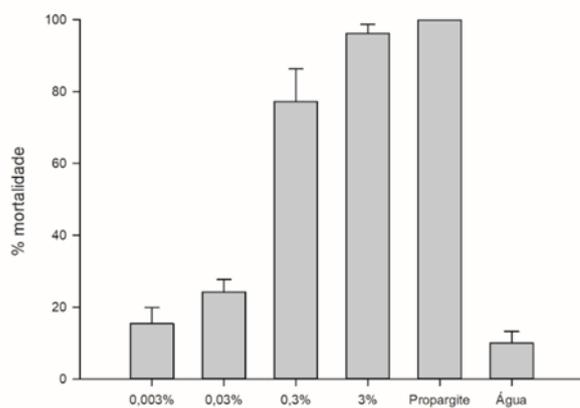
Figura 21



F1



F2



F3

Figura 22

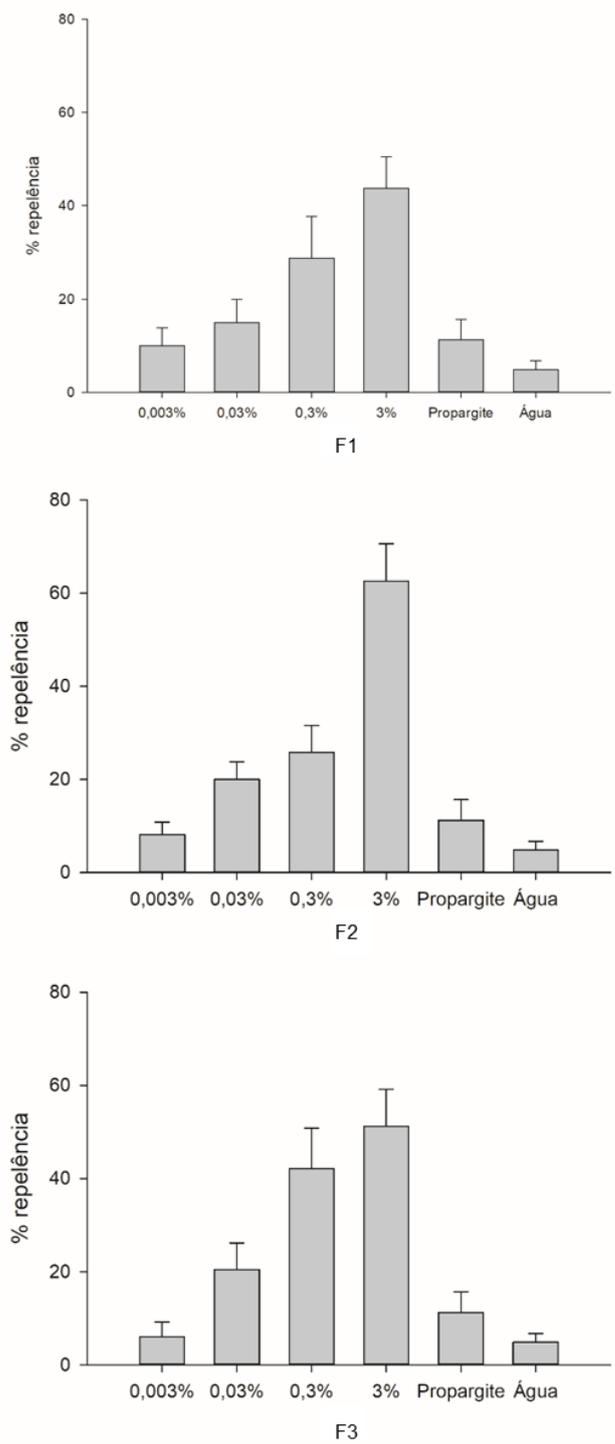


Figura 23

RESUMO**COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS NATURAIS COM INTRÍNSECA AÇÃO ANESTÉSICA,
BACTERICIDA, ANTIFÚNGICA E BIOPESTICIDA CONTRA LAGARTAS,
CARUNCHOS E ÁCAROS**

A presente invenção se relaciona a formulações compreendendo carreadores lipídicos nanoestruturados. Especificamente, a formulação ora pleiteada compreende nanopartículas carreadoras lipídicas (NLC) naturais cuja composição estritamente natural permite o encapsulamento de óleos essenciais com notável perfil de estabilidade mantendo tamanho e uma distribuição de diâmetro médio homogêneos após 1 ano de monitoramento em temperatura ambiente. Tal característica permite a obtenção de uma pluralidade de efeitos intrínsecos, com ação anestésica, bactericida, antifúngica e biopesticida contra lagartas, carunchos e ácaros, sem exigir o encapsulamento de princípios ativos sintéticos.

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.
Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

Recibo do Pagador

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 12001.273171 3 77350000007000

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço				
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS UNICAMP CPF/CNPJ: 46068425000133				
CIDADE UNIVERSITARIA ZEFERINO VAZ, CAMPINAS -SP CEP:13084971				
Sacador/Avalista				
No. Documento	Nr. Documento	Data de Vencimento	Valor do Documento	(=) Valor Pago
29409161812001273	29409161812001273	11/12/2018	70,00	
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço				
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37				
RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS . RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910				
Agência/Código do Beneficiário			Autenticação Mecânica	
2234-9 / 333028-1				

BANCO DO BRASIL | 001-9 | 00190.00009 02940.916188 12001.273171 3 77350000007000

Local de Pagamento					Data de Vencimento				
PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO					11/12/2018				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ					Agência/Código do Beneficiário				
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37					2234-9 / 333028-1				
Data do Documento	Nr. Documento	Espécie DOC	Aceite	Data do Processamento	Nosso Número				
12/11/2018	29409161812001273	DS	N	12/11/2018	29409161812001273				
Uso do Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	xValor	(=) Valor do Documento				
29409161812001273	17	RS			70,00				
Informações de Responsabilidade do Beneficiário					(-) Desconto/Abatimento				
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.									
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.									
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento.					(+) Juros/Multa				
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT					(=) Valor Cobrado				
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço					Código de Baixa				
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS UNICAMP CPF/CNPJ: 46068425000133					Autenticação Mecânica				
CIDADE UNIVERSITARIA ZEFERINO VAZ,					Ficha de Compensação				
CAMPINAS-SP CEP:13084971									
Sacador/Avalista									



21/11/2018 - BANCO DO BRASIL - 13:07:59
420304203 0011

COMPROVANTE DE PAGAMENTO DE TITULOS

CLIENTE: UNICAMP-MOVIMENTO TESOIRO
AGENCIA: 4203-X CONTA: 131.009-7

=====

BANCO DO BRASIL

00190000090294091618812001273171377350000007000

BENEFICIARIO:

INSTITUTO N P I - INPI

NOME FANTASIA:

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE I

CNPJ: 42.521.088/0001-37

PAGADOR:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS U

CNPJ: 46.068.425/0001-33

NR. DOCUMENTO 112.166

NOSSO NUMERO 29409161812001273

CONVENIO 02940916

DATA DE VENCIMENTO 11/12/2018

DATA DO PAGAMENTO 21/11/2018

VALOR DO DOCUMENTO 70,00

VALOR COBRADO 70,00
=====

NR.AUTENTICACAO 2.24A.485.600.595.4E2

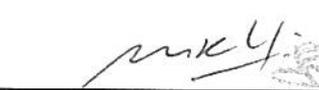


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PROCURAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, autarquia em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, neste ato representada por seu **Magnífico Reitor Professor Doutor Marcelo Knobel**, constitui e nomeia **PATRÍCIA FRANCO LEAL GESTIC**, brasileira, casada, engenheira de alimentos, portadora do RG nº 32.372.385-8, inscrita no CPF nº 219.274.108-19, matrícula 30.418-9; **CIRO DE LA CERDA**, argentino, solteiro, engenheiro de produção mecânica, portador do RG nº W255248-9, inscrito no CPF nº 045.845.188-66, matrícula 17.857-8; e **NEWTON CESARIO FRATESCHI**, brasileiro, casado, físico, portador do RG nº 13771984, inscrito no CPF 059.239.518-94, matrícula 265942; todos lotados na Agência de Inovação Inova Unicamp, com endereço na Av. Roxo Moreira, 1831, Caixa Postal 6131, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, em Campinas-SP; a quem confere poderes para, nos termos dos atos normativos, das portarias e das resoluções baixadas pelo INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL - INPI, requerer pedidos de proteção de propriedade industrial desenvolvidos pela Unicamp, junto ao **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL** através do sistema e-INPI, com poderes para praticar todos os atos que se fizerem necessários aos pedidos e manutenção da proteção de direitos de propriedade intelectual em benefício da outorgante junto ao INPI, sendo vedado o substabelecimento dos poderes ora concedidos. Esta procuração terá vigência de 2 (dois anos), a partir da data de sua assinatura.

Campinas, 15 de abril de 2019


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Professor Doutor Marcelo Knobel
Reitor - UNICAMP

CBC	CARTÓRIO DO DISTRITO DE BARÃO GERALDO	José Maria de Almeida César Juiz de Direito	Rua Nura Mussi de Camargo Pe Barão Geraldo - Campinas Fone: (19) 3749-7333 cartorlobg@uol.com.br - www.cart
RECONHECIDO por semelhança com a(s) assinatura(s) de MARCELO KNOBEL Campinas, 15 de abril de 2019. EM TELA.			
GABRIEL DE MOURA RIBEIRO		ESCRIVÃO DE CARTÓRIO	114487
Custas: R\$ 6,42		Carimbo: 2694326	FIRMA
Selos(s): 82442-S1AA		SEM VALOR ECONOMICO	S10196A0824342

VALIDO SOMENTE COM O SELO DE AUTENTICIDADE SEM EMENDAS E/OU RASURAS*