



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

CARTA PATENTE Nº BR 102020008923-4

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

(21) Número do Depósito: BR 102020008923-4

(22) Data do Depósito: 05/05/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2021

(51) Classificação Internacional: A61L 26/00.

(52) Classificação CPC: A61L 26/0009; A61L 26/0057; A61L 2300/30.

(54) Título: MEMBRANA INCORPORADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO OS MESMOS E USOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: VALDEMIR DA COSTA SILVA; IRINALDO DINIZ BASÍLIO JÚNIOR; TICIANO GOMES DO NASCIMENTO; NAIANNY LÍVIA OLIVEIRA NASCIMENTO MERGULHÃO; JUCENIR DOS SANTOS; MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART; LAISA CAROLINA GOMES DE BULHÕES; ILZA FERNANDA BARBOZA DUARTE; SAULO VITOR SILVA; JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS; JENIFFER MCLAINÉ DUARTE DE FREITAS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 05/05/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 22/07/2025

Assinado digitalmente por:
Gisela Aparecida Silva Nogueira
Diretora de Patentes Substituta

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**MEMBRANA INCORPORADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO OS MESMOS E USOS**”

[01] A presente invenção pertence aos campos biotecnológico, farmacêutico e cosmético, mais especificamente à área de produtos naturais com utilidade em saúde pública. É proposta membrana composta de nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (MNPV), processo de obtenção de MNPV, composições farmacêuticas contendo MNPV, processo de obtenção de composições farmacêuticas contendo MNPV e usos. A produção de MNPV está ligada à utilização de extrato hidroalcoólico padronizado de própolis vermelha, seguido pela técnica de obtenção das nanopartículas de PLA bioabsorvíveis carregada com o extrato da própolis vermelha de Alagoas e da membrana. Adicionalmente, o presente pedido trata de composições farmacêuticas contendo a dita MNPV. A MNPV apresenta aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética, principalmente devido a suas atividades antioxidante e estabilidade térmica, sobretudo por se tratar de produto de uso tópico.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Biomateriais Poliméricos

[02] A definição de biomaterial foi proposta pela Conferência de Desenvolvimento de Consenso dos Institutos Nacionais de Saúde como "Qualquer substância (que não seja droga) ou uma combinação de substâncias, sintéticas ou de origem natural, que possa ser usada durante qualquer período de tempo, como um todo ou como uma parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo" (**BORETOS, J.W., EDEN, M. Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects. Noyes Publications, Park Ridge, NJ, p. 232–233. 1984).**

[03] A biocompatibilidade é um requisito primordial para os biomateriais. É considerada como um fator de grande importância para sua aplicação em processos fisiológicos de períodos curtos ou longos, sem causar graves efeitos deletérios a nível local ou sistêmico (**SANTOS, L.A. LOUREIRO DOS. Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties ☆. Reference Module In Materials Science And Materials Engineering, [s.l.], p. 1-6, 2017**). Os avanços científicos e tecnológicos nas últimas duas décadas, tem favorecido a pesquisas na busca de novos biomateriais. Os biomateriais podem ser produzidos a partir de diferentes matérias-primas como cerâmica, metais e polímeros (**TANG, XIAOYAN et al. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Natural And Synthetic Biomedical Polymers, [s.l.], p.351-371, 2014**).

[04] Polímeros são ditos como macromoléculas, naturais ou sintéticas, formadas pela junção de monômeros (conhecido como unidades menores) ligados covalentemente entre si (**EBDON, J. R.. Introduction to polymers (second edition) R. J. Young and P. A. Lovell Chapman and Hall, London, 1991. pp. 443, ISBN 0-412-30640-9 (PB); ISBN 0-412-30630-1 (HB). Polymer International, v. 27, n. 2, p.207-208, 1992.; KOUTSOS, V. Polymeric materials: an introduction. In: Forde M, Telford T. ICE Manual of construction materials. London. p. 571-77, 2009; SANTOS, GEORGE GONÇALVES DOS; MARINHO, SÔNIA MARIA OLIVEIRA CAVALCANTI; MIGUEL, FÚLVIO BORGES. Polymers as biomaterials for cartilaginous tissue. Revista de Ciências Médicas e Biológicas. Salvador, p. 367-373. dez. 2013.**). Os polímeros vêm ganhando destaque frente aos materiais metálicos e cerâmicos devido sua capacidade de ser compatível com o corpo humano. Além disso, por apresentar flexibilidade, biodegradação enzimática, processabilidade e baixo custo (**D. D. RAMAKRISHNA, P. Rao, Is nanoparticle toxicity a concern? J. Int. Fed. Clin. Chem. 22 (2011). Online.**

[05] A origem dos polímeros pode ser de ordem natural ou sintética, são amplamente aplicados em áreas distintas como: médica, odontológica e farmacêutica. Isso ocorre devido apresentarem versatilidade quanto as propriedades químicas, biológicas e mecânicas. Dentre os principais polímeros de origem natural, destaca-se a quitosana, gelatina, seda, heparina, colágeno e albumina, ambos são amplamente investigados na comunidade científica **(MORENO-VEGA, AURA-ILEANA et al. Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications. Journal Of Nanotechnology, [s.l.], v. 2012, p.1-10, 2012)**. Os polímeros naturais são vistos como possíveis candidatos primários como biomaterial, pois ocorrem de maneira natural no meio ambiente, são biocompatíveis e biodegradáveis por enzimas **(L.S. NAIR, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials. Prog. Polym. Sci. v.32, n. 8-9, p. 762–798, 2007; TANG, XIAOYAN et al. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Natural And Synthetic Biomedical Polymers, [s.l.], p.351-371, 2014)**. Porém, alguns fatores intrínsecos como a estrutura química complexa, propriedades químicas e físicas de degradação instáveis e a indução de resposta imune indesejável, são compreendidos como impedimento para aplicação como biomaterial **(TANG, XIAOYAN et al. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Natural And Synthetic Biomedical Polymers, [s.l.], p.351-371, 2014)**.

[06] Os biomateriais poliméricos de origem sintética despertam interesse de pesquisa e aplicação de maneira crescente nas áreas biomédicas com a engenharia de tecidos e em diferentes campos da saúde, voltado para produção de dispositivos odontológicos e médicos-hospitalar como, por exemplo, braquetes ortodônticos, sondas nasogástricas, balão intragástrico, **(MARTIN, I. et al. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. J. Cell. Biochem., New York, v. 83, n. 1, p. 121-28, 2001)**, dispositivos terapêuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftálmico, substituto de

pele, sistema de liberação de fármacos, e sensores com a finalidade para diagnósticos **(CORTÉS MGR, DÍAZ BMV, PERILLA JE. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. Rev Ingen Investig. v.28, n. 1, p. 57-71. 2008.)**. Diferente dos polímeros de origem natural, os sintéticos apresentam vantagens superiores com maior uniformidade e estabilidade das propriedades químicas e mecânicas, possibilitando sua projeção de acordo com a finalidade de aplicação.

[07] Em se tratando do interesse na utilização dos polímeros, como poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), copolímero poli (lactídeo-co-glicolídeo), poliésteres, poliuretanos e poli (etilenoglicol) (PEG), policaprolactona (PCL), encontra-se nas vantagens em relação aos polímeros de origem natural, uma vez que permite uma produção padronizada mesmo em grande volume, obtendo um controle químico, estrutural e propriedades mecânicas com variações mínima **(BANIK, BRITTANY L.; BROWN, JUSTIN L. Polymeric Biomaterials in Nanomedicine. Natural And Synthetic Biomedical Polymers, [s.l.], p.387-395, 2014; SANTOS, L.A. LOUREIRO DOS. Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties ☆. Reference Module In Materials Science And Materials Engineering, [s.l.], p. 1-6, 2017)**. Além disso, a produção também permite a realização de alterações das propriedades como porosidade, cristalinidade, transição vítrea, peso molecular e outros.

Membranas Poliméricas

[08] Nas recentes décadas, as membranas poliméricas tem atraído muita atenção devido grande potencial de aplicação em diversas áreas, como, a biomédica, farmacêutica e no campo da biotecnologia. Diversos polímeros de origem natural são empregados na confecção de membranas ou biofilmes, destacando principalmente aqueles derivados de proteínas e polissacarídeos como: gelatina, isolado proteico de soja, caseína **(BATISTA, J. A. Desenvolvimento, caracterização e aplicações de biofilmes a base de**

pectina, gelatina e ácidos graxos em bananas e sementes de brócolos - Campinas, SP: [s.n.], 2004.), celulose (LEE, SU YEON et al. Synthesis and in vitro characterizations of porous carboxymethyl cellulose-poly(ethylene oxide) hydrogel film. *Biomaterials Research*, [s.l.], v. 19, n. 1, p.1-11, 23 abr. 2015. Springer Nature.), amido de milho, alginato, pectina, quitosana (CROISIER, FLORENCE; JÉRÔME, CHRISTINE. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, [s.l.], v. 49, n. 4, p.780-792, abr. 2013. Elsevier BV) e outros.

[09] A celulose ganha destaque em importância por ser o polímero obtido de fontes renováveis e por ser o mais abundante na natureza dentre os polímeros polissacarídeos (MELIN, GIOVANNA RODRIGUES. *Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica*. 2013. Dissertação (Mestrado em Têxtil e Moda) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013). Tendo em vista sua abundância, polímeros celulósicos tem sido uma alternativa na aplicação de dispositivos biomédicos que inclui membranas para hemodiálise e controle de difusão, imobilização enzimática em biosensores, revestimento para drogas, melhorando a taxa de liberação de fármacos e no desenvolvimento de fibras ocas in vitro para perfusão (R.T. DE SILVA, P. PASBAKHS, S.M. LEE, A.Y. KIT, ZnO deposited/encapsulated halloysite–poly(lactic acid) (PLA) nanocomposites for high performance packaging films with improved mechanical and antimicrobial properties, *Appl. Clay Sci*, v. 111, p. 10–20, 2015.).

[10] A Carboximetilcelulose (CMC) é um polímero promissor, pois suas propriedades químicas são amplamente reconhecidas e permitem a modificação do polímero para que atenda às necessidades de aplicação de acordo a finalidade de uso. Derivada da celulose através de modificações químicas, a carboximetilcelulose é vista como um polímero de importância econômica devido ser utilizada em diversos seguimentos, principalmente como, na indústria alimentícia, utilizada como espessante, na área farmacêutica, cosmética e

biomédica, pois apresenta boa compatibilidade com a pele e membranas mucosas por serem fisiologicamente inofensiva (**CARASCHI, J. C.; CAMPANA, S. P. F.; Influência do Grau de Substituição e da Distribuição de Substituintes Sobre as Propriedades de Equilíbrio de Carboximetilcelulose em Solução Aquosa. Polímeros: Ciência e Tecnologia, Abr/Jun, p. 70-77, 1999.**).

[11] Normalmente, a CMC é comercializada na forma sódica em decorrência do modo de preparação a partir de uma reação de suspensão de celulose, hidróxido de sódio e ácido monocloroacético (**CARASCHI, J. C.; CAMPANA, S. P. F.; Influência do Grau de Substituição e da Distribuição de Substituintes Sobre as Propriedades de Equilíbrio de Carboximetilcelulose em Solução Aquosa. Polímeros: Ciência e Tecnologia, Abr/Jun, p. 70-77, 1999**). Uma das características marcante da CMC é a capacidade de absorção de água que ocorre graças a presença de substituintes com grupos $-CH_2-$ $-COO^-$ na cadeia de celulose gerando um afastamento das cadeias poliméricas e permitindo maior penetração de água.

[12] A propriedade de intumescimento da CMC é favorável para o desenvolvimento de biomateriais do tipo membranas poliméricas com a finalidade de acelerar o processo de cicatrização de feridas abertas de estágios I e II (feridas com produção de pouco exsudato), pois permite a absorção de exsudato e mantém ainda um ambiente úmido favorecendo a cicatrização, pois a umidade natural reduz a desidratação e a formação de crosta, o que estimula a epitelização (**SANTOS, L.A. LOUREIRO DOS. Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties. Reference Module In Materials Science And Materials Engineering, [s.l.], p. 1-6, 2017. Elsevier**). Desta forma, é crescente o interesse da medicina pelas formas de tratamento de feridas cutâneas vem desde a antiguidade. Inclui desde métodos clínicos e cirúrgicos, assim como métodos curativos utilizando numerosos materiais naturais com a finalidade de auxiliar recuperação tissular, visando aumentar a coagulação do sangue, absorção de exsudato e aceleração da cicatrização. A escolha do

material adequado para o curativo depende do tipo de ferida, tamanho, produção de exsudato e risco de infecções. **(RAJENDRAN, NARESH KUMAR et al. A review on nanoparticle based treatment for wound healing. Journal Of Drug Delivery Science And Technology, [s.l.], v. 44, p.421-430, abr. 2018. Elsevier BV).**

[13] Com a modernização e a busca de novos métodos para o tratamento de feridas cutâneas, é possível encontrar diversos tipos de curativos, como hidrogéis, membranas ou filme, cremes antibacterianos, pomadas e agentes antibacterianos em combinação com membranas poliméricas. A literatura revela que membranas carregadas com componentes bioativos têm mostrado potencial curativo de feridas. Além disso, outros materiais poliméricos sintéticos biodegradáveis e bioabsorvíveis tem mostrado promissores para recuperação tecidual **(RAJENDRAN et al., 2018)**. Dentre os polímeros, estão inclusos o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-coglicólico) - (PLGA) e policaprolactona (PCL), que podem ser utilizados na forma de membranas, blendas, nanopartículas e nanofibras carregadas de agentes bioativos para promover a cicatrização de feridas, sem a necessidade de remoção do curativo e com liberação controlada das substância ativas.

Poli-(Ácido láctico) e suas propriedades

[14] O poli (ácido láctico) (PLA) é um polímero biodegradável, pertencente à família de ácidos poliéster alifático, higroscópico e instável quando exposto a umidade. O ácido láctico (ácido 2-hidroxipopanoico), principal constituinte do PLA é uma molécula quiral simples, que permite ser encontrado como enantiômeros na forma levogira L-lactico e dextrogira D-lactico. **(DRUMRIGHT, B. R. E., GRUBER, P. R., & HENTON, D. E. Polylactic_Acid_Technology. v. 1, n. 23, p. 1841–1846, 2000.; AURAS, RAFAEL; HARTE, BRUCE; SELKE, SUSAN. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. Macromolecular Bioscience, [s.l.], v. 4, n. 9, p.835-864, 16 set. 2004. Wiley; R.T. DE SILVA, P. PASBAKHS, S.M. LEE, A.Y. KIT, ZnO deposited/encapsulated halloysite–poly(lactic acid) (PLA) nanocomposites for high performance packaging**

films with improved mechanical and antimicrobial properties, Appl. Clay Sci, v. 111, p. 10–20, 2015.).

[15] O PLA é um ácido orgânico de origem natural, derivado de produtos renováveis como a cana de açúcar, batata e amido de milho através da fermentação bacteriana dos carboidratos ou por síntese química. A fermentação bacteriana é o processo industrial preferido. Uma vez que sua produção tem origem natural, ele é classificado como um material renovável (polímero verde). Portanto, o PLA é ecologicamente correto, por não ser tóxico e está classificado como “Generally Recognized as Safe” (GRAS) geralmente reconhecido como seguro pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA), **(AURAS et al., 2004).**

[16] As propriedades físico-químicas do PLA têm sido amplamente investigadas por muitos pesquisadores. Diversos fatores estão diretamente relacionados com as propriedades do PLA como a estereoquímica e a temperatura, sendo estes fatores primordiais para alterações de cristalinidade. Assim, a cristalinidade é uma importante propriedade que influencia no grau de dureza, modulo, resistência a tração, ponto de fusão e outros **(FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; LACERDA, Franschini, R., Plesu, R., Sarasua, J.R., Prud home, R.E., Cracking in polylactide spherulites. J. polym. Sci. Part B: Polym. Phys. v. 43, p. 3308–3315, 2005; T. MALMGREN, J. MAYS, M. PYDA. Characterization of poly(lactic acid) by size exclusion chromatography, differential refractometry, light scattering and thermal analysisJ. Therm. Anal. Calorim, v. 83 p. 35–40, 2006.; S. FARAH, D.G. ANDERSON, R. LANGER, Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications – a comprehensive review, Adv. Drug Delivery Ver, v. 107 p. 367–392, 2016).** As características físicas, como densidade, propriedade mecânica reológica e capacidade calorimétrica são dependentes da temperatura de transição vítrea.

[17] Os homopolímeros como D-Lactico e L-Lactico apresentam estrutura regular e desenvolve uma fase cristalina, apresentando maior resistência a tração e maior tempo de degradação. Já a mistura racêmica em diferentes proporções dos enantiômeros produzem um polímero amorfo (D,L-Lactico) ou (D,L-PLA) com propriedade mecânicas mais atenuadas, possibilitando maior degradação do polímero em menor tempo. A transição vítrea (T_g) assim como a temperatura de fusão são parâmetros importantes avaliados no PLA. Para PLA amorfo, mudanças dramáticas na estrutura do polímero podem ser observadas como por exemplo a mobilidade da cadeia, quando ocorre elevada T_g . Para semicristalino PLA, tanto a T_g quanto a temperatura de fusão (T_m) são parâmetros físicos importantes para prever o comportamento do PLA **(AURAS et al., 2004; SILVA, 2015; FARAH et al., 2016)**.

[18] A solubilidade ocorre em solventes de média a baixa polaridade, como acetonitrila, acetona, clorofórmio, cloreto de metileno e ácido dicloroacético e tetrahidrofurano e **outros (Sodergard, A., STOLD, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. Prog. Mater. Sci, v. 27, p. 1123–1163, 2002; LASPRILLA, Astrid J.r. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. Biotechnology Advances, [s.l.], v. 30, n. 1, p.321-328, jan. 2012. Elsevier BV)**. A degradação do PLA promove uma mudança irreversível severa, comprometendo suas propriedades de maneira gradual quando exposta a diferentes ambientes por tempo prolongado. Diferentes mecanismos estão envolvidos no processo de degradação e perda de propriedades. Amplamente estudado, a literatura destaca a ocorrência por hidrólise química, microbiana, degradação fotoquímica, térmica e enzimática, que principalmente ocorrem por cisão da cadeia principal ou cisão da cadeia lateral. **(AURAS, RAFAEL; HARTE, BRUCE; SELKE, SUSAN. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. Macromolecular Bioscience, [s.l.], v. 4, n. 9, p.835-864, 16 set. 2004. Wiley; MULLER, R. Biodegradability of polymers: Regulations and methods of**

testing. In: Steinbüchel, A. (Ed.), **Biopolymers, General Aspects and Special Applications**, v. 10, p. 366–388 (Chapter 12). 2008.).

[19] A degradação por hidrólise é a forma mais comum, normalmente ocorre em duas etapas. A primeira é marcada pela ruptura da cadeia não enzimática dos grupos éster, levando uma redução gradativa do peso molecular, formando oligopolímeros (polímeros hidrobiodegradáveis). Por vezes, essa etapa pode ser mais rápida com o uso de ácido ou bases. A segunda etapa é caracterizada pela redução até formar monômeros de ácido lático, este por sua vez será utilizado por microorganismos, produzindo dióxido de carbono, metano e água (**AURAS et al., 2004; MULLER, 2012**). O comportamento de biodegradação de poliéster é uma característica fundamental e de grande importância que desperta interesse em seu uso em diversas vertentes, destacando aplicações médicas e na indústria. Degradação de PLA foi estudado em corpos animais e humanos para aplicações médicas como implantes, suturas cirúrgicas e materiais de entrega de medicamentos. (K. **HAMAD, M. KASEEM, H.W. YANG, F. DERI, Y.G. KO, Properties and medical applications of polylactic acid: A review. Express Polym Lett**, v.1, n.9, p.435–455, 2015; S. **FARAH, D.G. ANDERSON, R. LANGER, Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications – a comprehensive review, Adv. Drug Delivery Ver**, v. 107 p. 367–392, 2016).

[20] O processo de biodegradação e absorção do PLA *in vivo* é descrito na literatura como uma longa cascata de eventos. Ao ser exposto aos fluidos corporais ocorre uma hidratação do polímero e sequenciado a isto inicia a lise das moléculas por meio de hidrólises das ligações ésteres, reduzindo a massa molar até formar monômeros atóxicos (**ALI, S.A.M. et al. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. Biomaterials**, [s.l.], v. 14, n. 9, p.648-656, jul. 1993. Elsevier BV.; Z.M. **HUANG, Y.Z. ZHANG, M. KOTAKI, S. RAMAKRISHNA, Compos. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites Sci. Technol**, v. 3, p. 2223–2253, 2003; **BARBANTI, SAMUEL H.; ZAVAGLIA, CECÍLIA A. C.;**

DUEK, ELIANA A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. Polímeros, [s.l.], v. 15, n. 1, p.13-21, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO).

[21] A degradação ocorre por mecanismos enzimáticos ou por clivagem hidrolítica passiva, promovendo perda da resistência à tração e à compressão. Ao fim da biodegradação, ocorre início da bioreabsorção pelo organismo por meio da geração de subprodutos (ácidos orgânicos) oriundos do processo anterior. Terminada a hidrólise do material a degradação segue o processo de oxidação a ácido láctico (para o PLA) e que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A, ocorre a liberação de CO₂ e, conseqüentemente, a decomposição em citrato. Este último será então incorporado no Ciclo de Krebs, resultando em CO₂ e H₂O, podendo sua eliminação ser feita através da urina e da respiração. Desta forma ocorre absorção e metabolização do polímero **(HUANG et al., 2003; BARBANTI et al., 2005).**

[22] No cenário atual, a produção do PLA tornou-se crescente com a finalidade de aplicação no âmbito industrial, envolvendo diversos seguimentos como a área médica, fibras e têxteis, embalagem e manutenção, remediação ambiental, entre outras. As primeiras aplicações atribuídas ao PLA são datadas da década de 60 com utilização na área médica para implantes e dispositivos médicos como stents, suturas cirúrgicas, placas e parafusos para fixação óssea craniomaxilofacial **(AURAS J.Y. Lim, S.H. KIM, S. LIM, Y.H. KIM, Improvement of Flexural Strengths of Poly(L-lactic acid) by Solid-State Extrusion,2*. Extrusion Through Rectangular Die Macromol. Macromolecular Materials And Engineering, [s.l.], v. 288, n. 1, p.50-57, jan. 2003. Wiley)**, parafusos de interferência no tornozelo, joelho e mão; tachas e pinos para fixação de ligamentos, âncoras **(DEJONG E.S., DEBERARDINO T.M, BROOKS DE, JUDSON K. In vivo comparison of a metal versus a biodegradable suture anchor. Arthroscopy n.20, v. p.511–516, 2004)**, implantes de tecidos moles, engenharia de tecidos scaffolds, culturas de tecidos **(BARBANTI et al., 2005)**, dispositivos de liberação de medicamentos **(T.-Y. LIU, W.-C. LIN, M.-C. YANG,**

S.-Y. CHEN, Miscibility, thermal characterization and crystallization of poly(L-lactide) and poly(tetramethyleneadipate-co-terephthalate) blend membranes. Polymer, v. 46, p. 12586–12594, 2005).

[23] Dentre os sistemas de liberação de medicamentos, as nanopartículas poliméricas são relevantes no âmbito da pesquisa, uma vez que oferecem um meio para sistemas de entrega localizada ou direcionada de um fármaco para um tecido / órgãos específicos de interesse com uma taxa de liberação ideal. Poli (ácido láctico) (PLA) é frequentemente usado em estudos de administração de medicamentos devido ser um polímero biodegradável, e biocompatível e bioabsorvido, além disso, apresenta toxicidade muito baixa **(MU L, SEOW PH. Application of TPGS in polymeric nanoparticulate drug delivery system. Colloids Surfaces B.; v. 47, p. 90–97. 2006).**

Nanopartículas poliméricas

[24] Nanopartículas são formadas por uma matriz polimérica (nanoesferas) ou de um sistema reservatório no qual a o conteúdo central é de caráter hidrofóbico ou oleoso circundado por uma parede polimérica (nanocapsula) (BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. Pharmaceutical Science & Technology Today, v.3, n.5, p.163-171. 2000).

[25] As nanopartículas poliméricas e lipossomas estão entre os sistemas de entrega de fármacos mais aceitos e aprovados como GRAS **(AZEVEDO, LAIS FARIAS et al. Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit®E100-Pluronic. Journal Of Apicultural Research, [s.l.], v. 57, n. 2, p.255-270, 28 fev. 2018. Informa UK Limited).** Suas propriedades químicas e de biocompatibilidade foram vastamente estudadas e permitem que esses sistemas de entrega manométrico formado por polímeros naturais ou sintéticos possam ser úteis na liberação controlada de moléculas terapêuticas vacinas, hormônios, genes e drogas anticâncer com maior eficácia do que sistemas micrométricos como micropartículas **(LEE, BYUNG KOOK; YUN, Yeonhee; PARK, Kinam. PLA micro- and nano-particles. Advanced Drug**

Delivery Reviews, [s.l.], v. 107, p.176-191, dez. 2016. Elsevier BV). Isto ocorre pelo fato da existência de elevada área de contato superficial, resultando em uma intensa interação entre a matriz na qual estão inseridos e as nanopartículas.

[26] Atualmente, os polímeros mais utilizados para a formação do sistema nanométrico são: poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-glicólico) - (PLGA) e policaprolactona (PCL). As nanopartículas e micropartículas podem ser obtidas através de diferentes técnicas que podem ser classificadas em quatro categorias. A categoria 1 é um método tradicional baseado na formação de uma emulsão que consiste em emulsão única, emulsão dupla e emulsões múltiplas, seguido da evaporação do solvente. Categoria 2 são métodos baseados em nanoprecipitação, rápida expansão de fluido supercrítico em líquido, salga e diálise. A categoria 3 consiste em métodos de composição direta, como técnica de fusão, secagem por spray-drying, fluido supercrítico. A categoria 4 inclui novas abordagens, incluindo técnica microfluídica e técnica baseada em molde / molde. Outros critérios dependem do modo de encapsulamento da droga. A droga é aprisionada dentro das partículas de "cápsulas" ou dispersa em matrizes poliméricas **(LEE, BYUNG KOOK; YUN, Yeonhee; PARK, Kinam. PLA micro- and nano-particles. Advanced Drug Delivery Reviews, [s.l.], v. 107, p.176-191, dez. 2016. Elsevier BV.; AZEVEDO, LAIS FARIAS et al. Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit®E100-Pluronic. Journal Of Apicultural Research, [s.l.], v. 57, n. 2, p.255-270, 28 fev. 2018. Informa UK Limited.))**.

[27] As principais substâncias ativas utilizadas para encapsulação pelos métodos de obtenção de nanopartículas são substâncias isoladas. Poucos autores publicaram trabalhos com a encapsulação nanométrica de produtos naturais como por exemplo extrato de plantas. No entanto, alguns autores desenvolveram nanopartículas poliméricas de extrato de própolis vermelha brasileira para avaliação da atividade leishmanicida, contribuindo com o

desenvolvimento de tecnologias nanoestruturadas de produtos naturais (NASCIMENTO, TICIANO GOMES DO et al. **Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity.** *Nanoscale Research Letters*, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-16, 17 jun. 2016; AZEVEDO, LAIS FARIAS et al. **Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit®E100-Pluronic.** *Journal Of Apicultural Research*, [s.l.], v. 57, n. 2, p.255-270, 28 fev. 2018).

Própolis

[28] A própolis é uma substância de composição complexa, formada por material gomoso e balsâmico, coletada pelas abelhas dos brotos, exsudatos de árvores, ceras e outras partes de tecido vegetal alterado na colmeia por adição de secreção salivar (MARCUCCI MC, DE CAMARGO FA, LOPES CMA. **Identification of aminoacids in brazilian própolis.** *Z Naturforsch C.*; v. 51, n. 1-2, p. 11-4, 1996; RUFATTO, Luciane Corbellini et al. **Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity.** *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, [s.l.], v. 7, n. 7, p.591-598, jul. 2017). As secreções salivares que são acrescentadas aos materiais coletados contêm a enzima β -glicosidase, que provoca a hidrólise dos flavonoides glicosilados em flavonoides agliconas (PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S. & ALCICI, N.M.F. 1988. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações.** *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos* v.183, p. 13–318, 1998.; BURDOCK, J.S. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis.** *Food and Chemical Toxicology* v.36, p. 347–363, 1998), formando por sua vez o produto final.

[29] A palavra própolis é derivada do grego *pro* – para ou em defesa, e *polis* – a cidade, dando o significado de “em proteção da colmeia” (GHISALBERTI, E.L. **Propolis: a review.** *Bee World* v.60, p. 59–80. 1979). As abelhas usam esta substância para protegê-las contra insetos e micro-organismos, empregando-a em finas camadas nas paredes internas das colmeias para vedar buracos e

rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colmeia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores **(BANKOVA, VASSYA S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, [s.l.], v. 31, n. 1, p.3-15, jan. 2000. Springer Nature).**

[30] Sua composição química está ligada diretamente com a flora da região, com a sazonalidade e locais, com a técnica empregada para a produção e com as diferentes características genéticas das abelhas **(PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, NETO FRA 2002. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Quim Nova, v.25, p.321-326. 2002.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S. & ALCICI, N.M.F. 1988. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos v.183, p. 13–318, 1998.).**

[31] A própolis contém uma fração resinosa solúvel em água ou solventes orgânicos, nesta fração são encontrados os principais compostos com atividade biológica. Em linhas gerais, ela contém 50-60 % de resinas e bálsamos vegetais, 30 - 40 % de ceras, 5 -10 % de óleos essenciais aromáticos **(GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. Bee World v.60, p. 59–80. 1979).**

[32] Foram identificados o quantitativo maior que 300 constituintes, em diversas amostras diferentes de própolis **(PEREIRA et, al., 2002).** Os constituintes majoritários da própolis brasileira são os ácidos fenólicos, sendo mais abundante do que os flavonoides.

[33] Os compostos fenólicos correspondem a um enorme número de substâncias orgânicas, são compostos aromáticos, que possuem o grupamento hidroxila como substituinte. O composto mais conhecido e comum é o fenol simples, podendo ser originado a partir da reação de descarboxilação de ácidos fenólicos (eliminação de um grupo carbóxilo na forma de CO₂), atividade microbiana ou degradação térmica da liginina. Na natureza, os compostos fenólicos não estão no estado livre, apresentando-se sob forma de heterosídeos e ésteres **(OLDONI, TATIANA LUIZA CADORIN. Isolamento e identificação**

de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzidas por abelhas *Apis mellefera*. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.), são muito reativos quimicamente e isso dificulta seu isolamento direto do vegetal. Outra característica que ganha destaque em importância, é facilidade com que os compostos fenólicos oxidam, tanto por meio de enzimas vegetais específicas, quanto por exposição a luz, metais, calor ou meio alcalino, promovendo o escurecimento das soluções ou frações de compostos isolados (SIMÕES, C. M.C.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLLO, J. C. P.; MENTIZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFSC/Ed. UFRGS, p. 833, 2001).

[34] A atividade antioxidante é principal propriedade biológica exercida por cada fenol em meios específicos. Essa atividade é influenciada de acordo com sua estrutura química e pode ser definida pela ação molecular como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros oxidantes e potencial quelante de metais), (OLDONI, 2007).

[35] A palavra flavonoide é advinda do latim *flavus*, que significa amarelo, representava os grupos de compostos que tinha coloração amarelada e um núcleo flavona. Destaca-se a função de defesa frente a radiação ultravioleta (UV) da luz solar, absorvem radiação eletromagnética na faixa do UV e do visível. Ademais representam barreira química de defesa contra micro-organismos (bactérias, fungos e vírus) e aleloquímicos contra insetos e herbívoros. São subdivididos em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonoides (flavononas e flavononóis), antocianidinas, isoflavonoides, auronas, neoflavonoides, biflavonoides, catequina e seus precursores metabólicos denominados de chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, BENT H. The biochemistry and

medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 96, n. 2-3, p.67-202, nov. 2002).

Propolis Vermelha

[36] No Brasil, inicialmente 12 tipos de própolis foram classificados de acordo com a região de onde foi coletada, aparência e coloração dos extratos (**PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. & ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. 2000**). Posteriormente, foi encontrada uma nova própolis em colmeias localizadas ao longo do litoral e manguezais do estado de Alagoas, classificada como própolis do grupo 13, denominada própolis vermelha, na qual dois isoflavonoides foram identificados, o pterocarpanos medicarpina e a isoflavona isosativana. Observou-se que abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae), que é uma leguminosa normalmente encontrada na América tropical e África, rica em isoflavonas, sugerindo que essa seja a origem botânica da própolis vermelha (**DAUGSCH A, MORAES CS, FORT P, PACHECO E, LIMA IB, ABREU JÁ, PARK, YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica, Mensagem Doce, 2006, nº 89; TRUSHEVA, B et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. Evidence Based Complementary And Alternative Medicine, v. 3, n. 2, p.249-254, jan. 2006**) e análises cromatográficas verificaram que as amostras de própolis e os exsudatos resinosos vermelhos apresentam perfis muito semelhantes em relação ao teor de flavonoides (**DAUGSCH A, MORAES CS, FORT P, PACHECO E, LIMA IB, ABREU JÁ, PARK, YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica, Mensagem Doce, 2006, nº 89**), com alta atividade antimicrobiana e antiradical livre.

[37] O perfil químico de amostras de própolis brasileira por UPLC / DAD-MS mostra a presença de substâncias glicosiladas nunca relatados anteriormente para nenhum tipo de própolis, como ácido-caféico-O-hexosídeo, além disso, foram detectados isoflavonoides como gliciridina, formononetina, vesitol, metilvesitol e biochanina A (**TRUSHEVA, B et al. Bioactive constituents of**

Brazilian red propolis. Evidence Based Complementary And Alternative Medicine, v. 3, n. 2, p.249-254, jan. 2006). Alguns desses compostos moleculares são encontrados apenas na própolis vermelha do nordeste do Brasil, diferenciando-a dos outros tipos já amplamente citados na literatura. Assim, sugere-se, que tais moléculas possam revelar atividades biológicas ainda não conhecidas.

[38] Dentre as propriedades farmacológicas dos marcadores encontrados na própolis vermelha. Foi descoberto que isoliquiritigenina inibe o crescimento de câncer prostático (**KANAZAWA, M., SATOMI, Y., MIZUTANI, Y., UKIMURA, O., KAWAUCHI, A., SAKAI, T., BABA, M. e OKUYAMA, T. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. European urology, v. 43, p. 580-586, 2003.**), e apresentam atividade antialérgica dependendo da sua concentração (**CHAN, S.C., CHANG, Y.S., WANG, J.P., CHEN, S.C. e KUO, S.C. Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of Dalbergia odorifera. Planta Médica, v. 64, p. 53-158, 1998**). A isoliquiritigenina e a liquiritigenina inibem a atividade da enzima xantina oxidase. A inibição da xantina oxidase foi sugerida para uso no tratamento de hepatites e tumores cerebrais, porque aumentam o nível de xantina oxidase sérica (**KONG, L.D., ZHANG, Y., PAN, X., TAN, R.X. e CHENG, C.H.K. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from Sinofranchetia chinensis. Cellular and molecular life sciences: CMLS, v. 57, p. 500-505, 2000.; DAUGSCH A, MORAES CS, FORT P, PACHECO E, LIMA IB, ABREU JÁ, PARK, YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica, Mensagem Doce, 2006, nº 89**).

[39] As propriedades biológicas, antibacteriana e antifúngica da própolis têm sido amplamente estudadas (**KUJUNGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J Ethnopharmacol, v.64, p.235-240, 1999.; LUSTOSA, S. R., GALINDO, A. B., NUNES, L. C. C., RANDAU, K. P., & ROLIM NETO, P. J. (2008). Propolis:**

Atualizacoes sobre a quimica e a farmacologia. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.18, n.3, p.447–454, 2008). Essas atividades estão relacionadas aos flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres, principalmente a flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletil de ácido caféico, com mecanismo de ação não totalmente elucidado, sugerindo que ocorra uma inibição do RNA- polimerase bacteriano **(UZEL, A., SORKUN, K., ÖNCAG, Ö., COGULU, D., GENÇAY, Ö. e SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiological Research, v.160, p.189 -195, 2005),** podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonoides, sesquiterpenos e hidroxiácidos **(MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, v. 26, n. 1, p. 83 – 89, 1995.).**

[40] Além da ação antibacteriana, a própolis apresenta excelentes atividades fungistática e fungicida, em testes *in vitro* contra leveduras identificadas como causadores de onicomicoses **(OLIVEIRA A.C.P, SHINOBU C.S, LONGHINI R, FRANCO SL, SVIDZINSKI TIE. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Mem Inst Oswaldo Cruz v. 101, p.493-497, 2006).** Ressaltam-se as infecções fúngicas como um problema de saúde pública nas últimas décadas, devido ao aumento significativo no número de pacientes imunocomprometidos **(PERES, N.T.A. Identificação de genes do fungo patogênico *Trichophyton rubrum* induzidos em resposta a Ambruticina durante interação com pele humana. In: Resumos do 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia. 104. 2007).**

[41] A própolis vermelha ou própolis do subtipo 13, tem sido alvo de estudo de muitos pesquisadores brasileiros. Alguns estudos de perfil enzimático de dermatófitos e atividade antifúngica, utilizando o extrato etanólico da própolis vermelha – EEPV demonstrou melhores resultados quando comparando com extrato etanólico da própolis verde frente a *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo que as amostras de *T. rubrum* demonstraram-se mais sensível para a atividade antifúngica dos extratos

alcoólicos de ambas as própolis (**SIQUEIRA, A.B.S. Perfil enzimático de dermatófitos e avaliação da atividade antifúngica de própolis e lectinas. – Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2008**).

[42] Os flavonoides e os ácidos fenólicos são substâncias majoritárias, sendo descritos como os principais agentes cicatrizantes de feridas e regeneração de tecidos (**ARVOUET-GRAND A, VENNAT B, POURRAT A, LEGRET P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. J Pharm Belg v. 49: p. 462-468, 1994**). Outros autores já tinham avaliado a efetividade do uso da própolis para cicatrização de ferimentos, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, neurodermites, eczemas, dermatite de contato, úlceras externas, psoríase, lepra, herpes simplex, zoster e genitalis, pruridos e dermatofitos (**GOETZ, P. Monographies médicalisées de phytothérapie: propolis. Phytotherapie, v. 3, p. 29-30, 1990**).

[43] A Própolis vermelha brasileira melhora a supressão da cicatrização de feridas cutâneas e fator de transcrição associado à inflamação NFkB. Assim, os compostos fenólicos representam papel fundamental no processo cicatricial de feridas, apresentando atividade antioxidante e consequentemente potencial anti-inflamatório (**CORRÊA, Flavia Regina Sobreira et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFkB. Biomedicine & Pharmacotherapy, [s.l.], v. 86, p.162-171, fev. 2017**). O uso da própolis vermelha como uma alternativa para acelerar o processo de cicatrização de ferida é promissor quando aplicado através de sistemas de liberação nanoparticulado incorporado em uma membrana polimérica.

[44] Foi verificada a existência de pedido de patente de nanoesferas com própolis vermelha com aplicação dermocosmética, utilizando como matriz polimérica o policaprolactona (PCL) **WO2018023182**. Este polímero apresenta composição química diferente do PLA (ácido láctico) que foi utilizado na patente em questão, além disso a aplicação do produto final é distinta.

[45] A patente brasileira (**BR 10 2018 009198 0 A2**) demonstra a preparação de curativos polimérico com formulação diferenciada incorporado com extrato hidroalcolólico de própolis vermelha com atividade moderada anti-alérgica e antimicrobiana. Uma formulação de adesivos com própolis foi desenvolvida utilizando como base polimérica o acetato de vinila e acrilato de butila por copolimerização em emulsão (**BR 10 2014 025178 2 A2**). Em contraposição, a invenção proposta no presente documento, utiliza excipientes como amido de milho e carboxmetilcelulose de sódio, que são de baixo custo para a produção da solução filmogênica da membrana tornando o produto final mais acessível economicamente. Além disso a patente usa preferencialmente extrato de propolis vermelha de Alagoas, contrapondo a patente BR 10 2014 025178 2 A2 que não utiliza o mesmo tipo de extrato.

[46] Uma membrana mucoadesiva incorporada com própolis vermelha foi desenvolvida com finalidade de cicatrização de vários tipos de feridas caracterizada por ser uma formulação de uma membrana biopolimérica e mucoadesiva, que utiliza como matriz polimérica a quitosana e o colágeno, plastificada preferencialmente com sorbitol e polietilenglicol (PEG), incorporada com o extrato ativo de própolis vermelha (**BR 10 2016 030857 7 A2**). No entanto, nenhum dos documentos de patente descritos utiliza a própolis vermelha nanoencapsulada com o polímero PLA (ácido láctico) incorporada a membrana polimérica que permite liberação controlada e prolongada do extrato. O pedido de patente BR 1020180091980 trata de membrana contendo própolis vermelha diretamente dispersa na formulação para aplicação no tratamento de feridas. A presente invenção deste documento utiliza a base semelhante da formulação do pedido citado. Entretanto, não possui o plastificante sorbitol e o extrato de propolis vermelha foi incorporado a membrana na forma de nanopartículas absorvíveis e biodegradáveis (nanopartículas de PLA carregada com própolis vermelha de Alagoas) e utilizada após secagem. Desta forma, o modo de preparo e a forma de uso são diferentes da patente citada evidenciando vantagens consideráveis frente ao estado da técnica.

[47] A presente invenção na modalidade proposta neste documento, busca sanar impasses tecnológicos em termos da aplicação da própolis vermelha como produto natural incorporado a membranas ou biofilmes e sua liberação e entrega em administração de uso tópico para o tratamento de feridas cutâneas. Desta maneira, propõem-se membrana composta de nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (MNPV) com atividade antioxidante.

[48] Ressalta-se que a utilização da nanopartícula de PLA carregada com extrato da própolis vermelha é resolutivo nesta inovação, em termos de desenvolvimento de membranas e biofilmes, visto que, a propolis vermelha na forma nanoencapsulada apresenta composição química rica em compostos fenólicos e em especial flavonoides, que, terá função determinante na ação anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e antioxidante para tratamento de feridas cutâneas.

[49] As vantagens que se destacam da membrana composta de nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (MNPV) e composição farmacêutica descrita na presente invenção, frente ao estado da técnica, está na utilização de compostos em uma matriz polimérica atóxica, bioabsorvível e biodegradável com a finalidade de revestimento intermediário de biomoléculas. Ainda, apresenta características reológicas e térmicas estáveis que possibilita a liberação do ativo dito como propolis vermelha. Neste cenário, a composição aqui descrita pode ser adotada para sanar problemas farmacotécnicos semi-industriais e industriais nas áreas biotecnológicas e farmacêuticas, assim como algumas aplicações de uso terapêutico no processo de cicatrização de feridas cutâneas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[50] A presente invenção apresenta membrana composta de nanopartículas de PLA (**encapsulante**) carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (MNPV), agente gelificante e espessante (**carboximetilcelulose sódica**), agente de estabilização e emulsificante (**pectina cítrica**), umectante (**propilenoglicol**) e dispersante (**água destilada q.s.p.**). A invenção trata também do processo de obtenção

de nanopartículas de PLA carregada com própolis vermelha pelo método de emulsificação e difusão do solvente, assim como obtenção da membrana com secagem em estufa com circulação de ar renovável e temperatura controlada. A composição compreende uma matriz polimérica contendo substância(s) ativa(s) de própolis vermelha nanoencapsulada associada com excipientes farmacêuticos. Ainda, a invenção trata do processo de preparação da composição, pela realização de misturas físicas com os nanoparticulados de própolis vermelha para garantir teor e uniformidade de conteúdo na mistura.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS/DESENHOS

[51] A modalidade da invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser melhor explanadas e compreendidas mediante referência às Figuras em anexo, com as seguintes descrições:

[52] A **Figura 1** anexa apresenta um fluxograma da preparação da nanopartícula da PLA carregada com Extrato Hidroalcoólico de Própolis Vermelha (EHPV).

[53] A **Figura 2** anexa apresenta imagem da preparação da Membrana incorporada com Nanopartículas de PLA carregada com Própolis Vermelha (MNPV).

[54] A **Figura 3** anexa apresenta a fotomicrografia de varredura eletrônica da superfície das nanopartículas sem e com própolis vermelha (NP e NPV).

[55] A **Figura 4** anexa apresenta a fotomicrografia de varredura eletrônica da superfície das membranas sem e com própolis vermelha (MNP e MNPV).

[56] A **Figura 5** anexa apresenta curvas termogravimétricas da degradação da NPV, PLA, NP e PV.

[57] A **Figura 6** anexa apresenta as curvas termogravimétricas da degradação da M base (placebo), MNP, MNPV.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[58] Os produtos, processos e usos descritos na presente invenção podem ser melhor detalhados e compreendidos mediante referência às Figuras presentes neste documento e a seguinte descrição:

Preparação do Extrato Bruto de Própolis Vermelha (EHPV)

[59] A própolis subtipo 13 (própolis vermelha), foi obtida do apiário localizado na região de mangue do município de Marechal Deodoro-AL (S9°42'10.2924" e W35°54'21.5316"). Uma amostra de 50 g de própolis foi submetida a processo de extração assistido por ultrassom na faixa de 80 a 167,7 mL de álcool etílico 50 a 80 °GL, preferivelmente entre 70 a 80 °GL, por período de até 40 minutos. Todo o processo ocorreu sempre em ambiente escuro, em sonicador (UltraCleaner 750 – Unique) com frequência constante de 25 KHz e potência de 100 W. Em seguida, o extrato foi filtrado e armazenado em frasco de vidro âmbar para melhor conservação. Após a completa extração, o material é concentrado em rotaevaporador, acoplado a uma bomba de vácuo, usando uma velocidade de rotação de 20 a 120 rpm, em banho-maria em faixa de temperatura de 35 a 55°C e pressão entre 400 a 700 mm Hg. Alternativamente, pode ser concentrado, usando banho-maria a 37 °C a 42 °C.

[60] Uma massa sólida escura avermelhada é obtida com percentagem de solvente entre 4 a 25%, sendo denominado extrato bruto de própolis vermelha. O extrato bruto (EHPV), preferivelmente, deverá apresentar percentagem de solvente entre 1 a 10%.

Preparação das Nanopartículas de PLA carregada com própolis vermelha (NPV)

[61] As nanopartículas descritas neste documento são obtidas pela técnica de emulsificação e difusão do solvente. Cerca de 300 mg do polímero PLA 75.000 g/mol (Biomater) são dissolvidos em acetona P.A (Synth) na faixa de 10 mL a 30 mL, preferivelmente em volume de 15 mL em frasco fechado e levado a banho maria a 70° C por 40 min. Em temperatura ambiente a solução de PLA obrigatoriamente deve ser vigorosamente agitada em agitador mecânico (IKA RW20) a 1000 RPM e sonicada em sonicador (UltraCleaner 750 – Unique, 25 KHz e potência de 100 W) simultaneamente à agitação por 6 minutos. Na etapa inicial para obtenção das nanopartículas o Tween 20 (Polyoxyethylene 20 sorbitan

monolaurate) é adicionado (136 µL) para formação de um sistema emulsionado, agitado por 60 segundos e na sequência 21 mg do EHPV é incorporado a solução de PLA. Na segunda etapa, lentamente deve ser adicionado com uma pipeta automática 10 mL de uma solução aquosa de Polietilenoglicol P.A 6000 - Synth (PEG 1% p/v) para formar uma emulsão (A/O) e obtenção das nanopartículas por precipitação e difusão do solvente, seguido de agitação contínua durante 18h horas para remoção residual do solvente orgânico. A nanopartícula obtida é congelada por 48h em freezer -20 e seca por liofilização (liofilizador Terroni LS 3000, Brasil) durante 24 h. Por fim a nanopartícula seca é armazenada em dessecador protegido da luz. O mesmo protocolo também foi seguido para a síntese da nanopartícula sem a própolis (NP).

Preparação da membrana carregada com nanopartícula de própolis vermelha (MNPV)

[62] A membrana descrita no presente documento dita como MNPV diferencia das já descritas no estado da técnica pelo fato de conter nanopartículas de PLA (ácido polilático) carregados com própolis vermelha de Alagoas em concentrações significativas de substâncias bioativas como flavonoides, isoflavonóides, chalconas e ácidos fenólicos específico da própolis vermelha.

[63] A MNPV, além do extrato com os princípios ativos de interesse, obtidos da própolis vermelha, apresentam em sua formulação, os excipientes farmacêuticos usuais com diferentes funcionalidades sendo eles: PLA polímero biodegradável, bioabsorvível e agente encapsulante **(PLA)**, composto ativo **(EHPV)**, agente **geilificante e espessante (Carboximetilcelulose sódica)**, agente de estabilização e emulsificante **(pectina cítrica)**, umectante **(propilenoglicol)** e dispersante **(água destilada q.s.p.)**.

[64] A presente invenção dita como MNPV em modalidade única apresenta-se como uma composição de: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha tecnicamente elaborado e padronizado assistido por ultrassom em proporção de extratos bioativos entre 5 a 95% de sólidos solúveis totais, preferivelmente entre 2 e 50%; nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha com teor na faixa de 1% a 25% , preferivelmente entre 5 e 10%; agente

espessante em proporção entre 1 e 80%; dispersante em proporção entre 1 e 80%; umectante em proporção entre 20 e 65%; agente de estabilização em proporção entre 5 e 80%.

[65] Na presente modalidade de invenção de membrana de própolis vermelha (MNPV), a uniformidade de espalhamento das nanopartículas contendo propolis vermelha ocorre devido a formulação da matriz polimérica da membrana consistir de excipientes como a carboximetilcelulose de sódio, cujo apresentam propriedades espessantes, produzindo viscosidade estável, assim como a presença de agente emulsificante e plastificante como a pectina cítrica, evitando consequentemente variações de uniformidade de conteúdo da MNPV.

[66] O ponto central inovador da membrana proposta no presente documento é a presença de nanopartículas de PLA carregada com extrato de própolis vermelha, que são bioabsorvíveis e biodegradáveis, permitindo a liberação do conteúdo *in loco* no tecido não íntegro. Desta forma, pode promover a cicatrização em menor tempo, devido a ação antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante da própolis vermelha. Além disso e não foi encontrado em qualquer das patentes disponíveis nos bancos de busca de patentes, uma membrana que contenha obrigatoriamente nanopartículas de PLA carregada de extrato de propolis vermelha.

[67] As etapas do processo de obtenção de MNPV incluem a preparação do extrato de própolis vermelha a partir da própolis bruta, preparação da nanopartícula de própolis vermelha, mistura física dos componentes da fórmula com as nanopartículas associada a própolis vermelha e secagem em um sistema com temperatura controlada em 40°C e renovação de ar. **(Figura 1).**

Preparação da mistura física contendo nanopartícula de própolis vermelha

[68] A formulação foi preparada utilizando hidrogel de carboximetilcelulose sódica (NaCMC) 0,5 a 10% elaborado previamente e complementado com pectina cítrica e propileno glicol. Para produção do gel, a NaCMC em pó foi pesada em balança analítica e, posteriormente, transferida para um béquer contendo um volume qsp para 100 mL de água destilada previamente medido

em uma proveta. A mistura dos componentes foi realizada com um agitador mecânico com rotação variando entre 200 e 2000 rpm até homogeneização e, em seguida, levado ao aparelho ultrassom por período que variou entre 10 e 30 minutos com temperatura de 30°C para melhor homogeneização do conteúdo. Em seguida, foram acrescentados os demais componentes da formulação sempre com agitação em misturador mecânico.

[69] Durante o processo de homogeneização, uma dada quantidade de nanopartículas carregadas com própolis vermelha foi incorporada à formulação em proporção que variou de 2 a 10%. As misturas foram colocadas sobre uma fôrma de diâmetro de 5 a 30 cm. Após um período de 48 horas de secagem em um sistema com temperatura controlada em 40 °C e renovação de ar, houve a formação de um filme.

Caracterização físico-química do EHPV, Nanopartículas e Membranas polimérica

[70] O extrato de própolis vermelha, a nanopartícula de PLA carregada com própolis vermelha e a membrana impregnada com nanopartículas de PLA após processo de obtenção foi caracterizado através de diferentes técnicas analíticas para comprovar a presença dos compostos fenólicos, assim como evidenciar atividade antioxidantes *in vitro*. Dentre as técnicas analíticas citamos:

[71] A) Tamanho, Índice de polidispersão e Potencial Zeta das nanopartículas. O tamanho da nanopartícula foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. O Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Inglaterra) foi utilizado para determinar o tamanho, a distribuição e o potencial Zeta das partículas. Para determinação destes parâmetros a NP e NPV foram pesadas em balança analítica e solubilizadas em acetona PA, obtendo assim uma solução de 400 µg/mL. A partir desta solução, uma alíquota de 1 mL foi coletada e levada a um balão com capacidade para 5 mL. Na sequência, adicionou-se 2 mL de água milliQ e 2 mL de uma solução de PLURONIC a 2 % previamente preparado. Após agitação em vórtex as amostras foram analisadas em triplicatas com scan 64. B) Ruptura das nanopartículas carregadas com própolis vermelha (NPV). Para

quantificar o teor de flavonoides e de fenóis totais, assim como avaliar a atividade antioxidante pelo método de DPPH e FRAP, foi necessário dissolver as nanopartículas em clorofórmio, obtendo uma solução límpida de 1 mg/mL. Após isso, a solução foi armazenada em balão âmbar até momento das análises. C) Extração da própolis vermelha impregnada como nanopartículas na membrana poliméricas. A membrana polimérica impregnada com a nanopartícula carregada com própolis vermelha foi pesada inteira em balança analítica (correspondente a 7 mg de PV) e foi triturada em almofariz e solubilizada em 10 mL de álcool a 50 % em banho ultrassônico durante 1h. Obtendo uma concentrações teórica de 0,7 mg/mL, no qual foi utilizado para avaliação de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante. D) Determinação do teor de fenóis totais. A determinação do conteúdo total de fenóis foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (RFC) descrito por WOISKY (1996), com modificações. Construiu-se a curva padrão de calibração utilizando-se ácido gálico em diferentes concentrações (2,0, 2,5, 3,0, ..., 6,0 µg/mL). Adicionou-se para um balão volumétrico de 5 mL, contendo 3,0 mL de água deionizada uma alíquota correspondente a cada concentração 0,4 mL de RFC. Agitou-se levemente por 15 segundos e no intervalo de 1 a 9 minutos, adicionou-se 0,6 mL da solução saturada de carbonato de sódio a 20 %. Completou-se com água até o volume final e agitou-se por mais 15 segundos. A reação ocorreu no escuro por 2 horas para que ocorresse a oxidação de fenóis. Observou-se a mudança de coloração, de esverdeado para azul. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 760 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados. O teor de fenóis totais do EHPV e NPV foi realizado a partir da solução estoque (4 mg/mL do EHPV, 1 mg/mL do NPV e 0,7 mg/mL da MNPV), diluiu-se para balões de 5mL concentrações de 20 µg/mL. Adicionou-se uma alíquota do EHPV ou NPV para um balão volumétrico de 5 mL. A seguir, utilizou-se a mesma metodologia descrita no a cima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável y, da equação $y = ax+b$. E) Determinação do teor de flavonoides totais.

A determinação dos flavonoides totais foi realizada de acordo com o método de cloreto de alumínio, descrito por WOISKY (1996), com pequenas alterações. Construiu-se a curva padrão de calibração utilizando-se quercetina em concentrações correspondentes de 4,0 até 14 µg/mL. Adicionou-se em um balão volumétrico de 5 mL, contendo previamente 3 mL de metanol uma alíquota de acordo com cada concentração e 0,1 mL da solução de AlCl_3 (5 %). O volume final completado com metanol, e em seguida agitou-se levemente por alguns segundos. Após o tempo de 30 minutos fez a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 425 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados. O teor de flavonoides do EHPV e NPV foi feito a partir da solução estoque (4 mg/mL do EHPV, 1 mg/mL da NPV e 0,7 mg/mL da MNPV), diluiu-se para balões de 5 mL concentrações de 100 µg/mL. Adicionou-se uma alíquota do EHPV ou NPV em um balão volumétrico de 5 mL, contendo previamente 3 mL de metanol, A seguir, utilizou-se a mesma metodologia descrita no item a cima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável y, da equação $y = ax + b$. F) Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH. A atividade sequestrante do radical DPPH foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Sales 2012, com modificações. Preparou-se uma solução 0,1 mM de radical DPPH (Sigma Aldrich) em etanol absoluto e foi armazenada em vidro âmbar. Em solução etanólica o radical DPPH tem coloração violeta, que ao entrar em contato com a amostra, reage e é sequestrado de acordo com a potência antioxidante, diminuindo gradualmente a cor violeta para o tom de amarelo pálido. Com a solução de DPPH em temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL a balões volumétricos âmbar de 5 mL, em seguida adicionou-se alíquotas nas concentrações de 1, 5, 10 e 25 µg/mL do EHPV, e aguardou a reação no escuro se desenvolveu durante 30 minutos. Do mesmo modo, realizou-se o mesmo processo de análise para a NPV e MNPV. Pós reação, os balões foram completados com etanol absoluto e fez-se a leitura das amostras em espectrofotômetro UV-Vis, modelo Shimadzu 1240, em comprimento de onda de

517 nm. A porcentagem de radical DPPH• remanescente, no tempo de 30 minutos, foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de DPPH• Remanescente = $[(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}})] \times 100$. G) Determinação da Atividade Antioxidante – pelo método FRAP. Construiu-se uma curva de calibração analítica a partir da solução aquosa do Sulfato Ferroso Heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) como padrão em concentrações crescente de 500, 750, 1000, 1250, 1500 e 2000 μM . Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 90 μL de cada solução de sulfato ferroso (500 até 2000 $\mu\text{M/mL}$) para balões de 5 mL, seguido de 270 μL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (preparado a partir de 25 mL da solução de tampão acetato a 0,3 M, 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) a 10 mM, e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM). Homogeneizaram-se as soluções em vórtex por um minuto. Na sequência as amostras foram mantidas em banho maria a 37°C por 30 minutos. Decorrido o tempo de reação, realizou-se leitura em espectrofotômetro UV-Vis, modelo Shimadzu 1240, em comprimento de onda de 595 nm. Utilizou-se o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro e calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados. O potencial antioxidante do EHPV, das nanopartículas carregada com própolis vermelha e MNPV foi investigado utilizando uma alíquota de 90 μL (25 μg) em triplicata. A seguir, utilizou-se a mesma metodologia supracitada. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável Y, da equação $Y = ax + b$ e expresso em μM de sulfato ferroso/g de própolis vermelha.

Caracterização das nanopartículas e membranas poliméricas:

[72] A) Eficiência de encapsulação do EHPV A eficiência de encapsulação da NPV foi avaliada por UPLC / DAD, levando em consideração o teor quantitativo do principal marcador da própolis vermelha (formononetina) identificado no EHPV. Inicialmente pesou-se 57,143 mg de NPV, que contem 7 % de própolis vermelha. Em seguida, em um balão volumétrico com capacidade para 10 mL solubilizou-se a NPV em clorofórmio padrão analítico, promovendo a ruptura das

nanopartículas, obtendo uma solução límpida com uma concentração final de 400 µg/mL. Para quantificar o marcador foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.4.2. e em seguida foi calculada a eficiência através da equação $EE\ (\%) = [QFTN / QFTE] * 10$, (EE= Eficiência de Encapsulação; QFTN= Quantidade de formononetina determinado no sistema polimérico - nanopartícula; QFTE= Quantidade de formononetina determinados no EHPV. B)

Identificação dos marcadores da própolis vermelha e das NPV por UPLC-DAD.

A identificação dos flavonoides contidos no EHPV e na NPV foram realizadas a partir da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com um detector de arranjo de diodos (UPLC-DAD) modelo Shimadzu, descrito por Nascimento et al 2016. O UPLC consiste dos seguintes módulos: uma bomba de alta pressão (Modelo LC- 20ADXR), desgaseificador (modelo DGU-20A3R), auto-injetor (modelo SIL-20AXR), forno de coluna cromatográfica, detectores de arranjo de diodos (modelo EPDM-20A) e detector de fluorescência (RF-20A modelo), um controlador (modelo CBM-20A) e um software Shimadzu Labsolution. A separação dos flavonoides ocorreu utilizando uma coluna de fase reversa (C 18, 150 x 4,6 mm; 5 µm), uma fase móvel que consistiu de solvente A (água Milli-Q) e o solvente B (acetonitrila), bombeado a um caudal de 0,3 mL/min. O gradiente de eluição inicial consistiu de água (70 %) e acetonitrila (30 %) com uma variação da percentagem de acetonitrila a 100 % em 40 min seguido de uma condição isocrática com acetonitrila (100 %) até 53 minutos e retorno a condição inicial a 54 min, seguido por condições de acetonitrila isocrático (30 %) até 60 min. Este método de comprimento foi desenvolvido a fim de lavar a coluna durante a análise com 100 % de acetonitrila e evitar a falta de exatidão e de precisão durante a eficiência do ensaio de retenção e para evitar a incrustação coluna e a acumulação de pressão excessiva por retenção irreversível de compostos não polares (terpenos e guttiferonas presentes no extrato de própolis vermelha). As identificações dos flavonoides foram feitas pela comparação dos espectros de ultravioleta, obtidos através do detector de arranjo de fotodiodos em diferentes comprimentos de onda (λ : 249, 281, 286, 275, 366 nm) e dos

tempos de retenção obtidos para os padrões e para as amostras. A partir da solução estoque (4 mg/mL do EHPV), diluiu-se com clorofórmio para balões de 5 mL afim de obter concentrações de 400 µg/mL, seguido de filtração através de um filtro de unidades de 0,22 µm, e (2 µL) em seguida injetada no UPLC-DAD, para a identificação de flavonoides no EHPV. Para a identificação de flavonoides nas NPV, foram pesados 100 mg e transferido para um balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se a concentração de 4 mg/mL. Em seguida para obter solubilização completa, deixou a amostra no banho ultrassom por 5 minutos, posteriormente a solução foi filtrada em filtro de papel e a partir desta, foi feita uma diluição, tomando uma alíquota de 1 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 10 mL, para obter uma concentração de 400 µg/mL. Esta solução foi filtrada através de um filtro de unidades de 0,22 µm, e (2 µL) em seguida injetada ao UPLC / DAD. C) Análise Termogravimétrica (TGA). Determinou-se as propriedades térmicas da NPV e da MNPV através das curvas termogravimétricas das amostras obtidas em equipamento Shimadzu modelo TGA-50, usando um cadinho de platina, atmosfera de nitrogênio, com vazão de 50 mL min⁻¹, entre as bandas de temperatura de 25 a 600 °C, com taxas de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A massa inicial das amostras analisadas foram aproximadamente 5mg. D) Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). As curvas de DSC foram realizadas em um equipamento Shimadzu modelo DSC-60, utilizando cadinho de alumínio e atmosfera de nitrogênio, com uma vazão de 50 mL min⁻¹ no intervalo de temperatura de 25-200 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, utilizando 2 mg das amostras. E) Infravermelho Transformada de Fourier – FTIR. Os espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras, na faixa de 4000 a 700 cm⁻¹, foram obtidos em espectrofotômetro FTIR modelo Nicolet iS 10 da Thermo Fisher SCIENTIFIC, no modo ATR, com 64 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente (≈20°C) com adição direta da nanopartícula com e sem própolis (em forma de pó) e membrana (em forma de filme) no aparelho, sem tratamento prévio. Esse ensaio foi realizado com o objetivo de identificar os

grupos funcionais químicos presentes no polímero PLA. F) Avaliação morfológica das nanopartículas e membranas poliméricas por MEV. A caracterização morfológica das nanopartículas e membranas foi obtida utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Uma pequena quantidade das nanopartículas e das membranas foi fixada em uma fita adesiva metálica de carbono de dupla face e montada sobre o stubs do microscópio com altura de 1,0 cm de altura e diâmetro de 1,0 cm. Este material foi transferido para o metalizador QUORUM Q150R ES para ser recoberto com uma fina camada de ouro, aplicando uma corrente de 45 mA por 200 segundos. O material foi analisado em MEV modelo TESCAN VEGA3 com aceleração de voltagem igual a 10 kV.

Usos de NPV, MNPV e de composições farmacêuticas contendo os mesmos

[73] Nos últimos cem anos, a literatura científica vem revelando a utilização da própolis, um produto natural com elevado potencial medicinal tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, apresenta diversas atividades biológicas consolidadas na literatura. Diante destas propriedades, a própolis pode ser utilizada em uma ampla gama de setores industriais, tais como cosmética e farmacêutica e biotecnológica.

[74] [074] A propolis vermelha apresenta destaque frente a outros grupos de própolis devido sua composição química diferenciada descritas no estado da técnica, apresentando substâncias que podem favorecer seu uso como princípio ativo na prevenção e tratamento de diversas doenças. Assim, indica atividades fisiológicas variadas, permitindo sua aplicação e apresentação em diferentes formas farmacêutica.

[75] Neste documento, a modalidade de invenção do tipo nanopartícula carregada com própolis vermelha é um produto intermediário ternário inovador que pode ser incorporado em diferentes formas farmacêuticas. As nanopartículas em sua composição apresentam características de um biomaterial com a capacidade de acelerar a regeneração de tecidos lesionados.

Além disso, a própolis vermelha com sua propriedade reparadora tissular demonstra elevado potencial na promoção da proliferação celular, induzindo a migração de células de fibroblastos. No processo de cicatrização de feridas, a proliferação de fibroblastos caracteriza como uma função fisiológica normal obtida a partir do processo de regeneração da pele. Assim, a própolis vermelha nanoparticulada incorporada em membranas pode ser indicada como um novo produto de aplicação tópica para promoção da cicatrização de feridas cutâneas.

[76] Em uma outra modalidade, a MNPV dita como membrana incorporada com nanopartículas de PLA carregada com própolis vermelha apresenta-se como uma matriz polimérica composta com excipientes promotores de intumescimento. Desta forma, a membrana aqui apresentada possibilita a absorção de exsudato gerado pela ferida. Ao passo que ocorre o intumescimento, ocorre a penetração das nanopartículas na ferida, esta por sua vez passa por um processo de hidrólise e liberação da própolis vermelha. A capacidade de intumescimento associada as características da nanopartícula de PLA com própolis vermelha como um biomaterial (bioabsorvível, biodegradável e atóxico), pode acelerar o processo cicatricial, principalmente pelo sinergismo de ação entre membrana, nanopartícula e própolis vermelha.

[77] As composições da NPV e MNPV (Figura 1) aqui apresentadas, demonstram atividades antioxidante pelos ensaios antioxidante DPPH e FRAP *in vitro* utilizando o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha como princípio ativo. Devidamente comprovada, as atividades biológicas, proveniente da atividade antioxidante do extrato que está presente nas composições de NPV e MNPV pelos processos propostos podem ser utilizadas para: acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas.

[78] Desta forma, as modalidades da invenção descritas no presente documento apresentam-se como um avanço no estado da técnica já que, permite a produção de nanopartícula da de PLA carregada com própolis vermelha (NPV), quanto a produção de membranas incorporada com NPV. Ambas as invenções aqui propostas foram obtidas por processos padronizados que caracteriza a

produção segura e reprodutível. Nesse contexto, as NPV e MNPV obtidos através do processo proposto podem ser utilizadas quanto suas atividades biológicas e atuação da própolis vermelha como produto em diversos setores em especial as industriais da área farmacêutica e biotecnológica.

EXEMPLOS

[79] As caracterizações das NPV e MNPV obtidas, através dos processos proposto neste documento demonstraram a obtenção de um produto adequado, rico em compostos fenólicos de atividade preservada. Os resultados obtidos estão representados nas tabelas e Figuras indicadas.

[80] **EXEMPLO 1** - Determinação de fenóis totais e flavonoides totais.

[81] A **Tabela 1** apresenta os teores de fenóis totais e flavonoides totais quantificados nas amostras do EHPV, NPV e MNPV. Foram encontrados no extrato, nanopartícula carregada com própolis, MNPV teores de 240,32, 191,70 e 183,4 mg EAG. g⁻¹ para compostos fenólicos e 37,8, 35,8 e 26,4 mg EQ. g⁻¹ para flavonoides totais, respectivamente. Com base nos resultados, observa-se similaridade entre os teores de fenóis totais quantificados no EHPV e na NPV, bem como para os teores de flavonoides totais, sendo assim, teores satisfatórios, constatando similaridade com a literatura.

Tabela 1 - Conteúdos totais de fenóis e flavonoides em amostras de extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV), nanopartículas da própolis vermelha (NPV) e membrana polimérica carregada com propolis vermelha.

Métodos de ensaio	Amostras		
	EHPV*	NPV*	MNPV*
¹ Fénóis Totais	240,32 ± 3,48	191,70 ± 0,34	183,4 ± 2,12
² Flavonoides Totais	37,8 ± 0,96	35,8 ± 3,99	26,4 ± 1,95

Média ± CV = Coeficiente de Variação;

1 - mg EAG. g⁻¹ Expressos como equivalente de ácido gálico por g de própolis vermelha);

2 - mg EQ. g⁻¹ Expressos como equivalente de quercetina, por g de própolis vermelha

[82] **EXEMPLO 2** - Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV), Nanopartícula de Própolis Vermelha (NPV) e Membrana impregnada com NPV (% inibição do radical DPPH) e FRAP.

[83] Os resultados obtidos (**Tabela 2 e 3**) revelam que o EHPV, a NPV e MNPV apresentam atividade antioxidante em ambas as metodologias, devido apresentar alto teor de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides. Muitos estudos relataram atividade antioxidante para os flavonoides, devido à sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres e eliminar os radicais livres. Além disso, os resultados mostram IC₅₀ de 0,85 e 0,87 µg/mL para o EHPV e NPV respectivamente superior ao relatado na literatura. Assim, observa-se na literatura grande variedade de constituintes da própolis, sendo este relacionado a variações nas concentrações de constituintes fenólicos e de flavonoides totais que ocorre em função de alguns fatores como: como a ecologia da flora, pelo período da coleta da resina, pela genética da abelha rainha, pela flora local e região da coleta.

Tabela 2 - Atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV), Nanopartícula de Própolis Vermelha (NPV) e Membrana impregnada com NPV (% inibição do radical DPPH).

	Concentração µg/mL / (%IR DPPH)				
	1	5	10	25	IC ₅₀
EHPV	58,56 ± 2,64	66,60 ± 1,00	75,99 ± 3,46	92,89 ± 0,02	0,85
NPV	57,58 ± 0,87	61,50 ± 0,95	66,08 ± 0,42	75,84 ± 3,97	0,87
MNPV	55,61 ± 1,22	59,70 ± 1,34	62,27 ± 0,79	67,81 ± 1,04	0,90

Média ±, CV = Coeficiente de variação

IC₅₀ = Capacidade de inibir o radical DPPH em 50 % - (µg/mL)

Tabela 3 - Atividade Antioxidante do EHPV, NPV e MNPV pelo método de redução de ferro.

	EHPV (mMolFeII/g)*	NPV (mMolFeII/g)*	MNPV (mMolFeII/g)*
FRAP	57,4	49,2	23,83

*= Equivalente de sulfato ferroso.

[84] **EXEMPLO 3** - Tamanho de partícula, Índice de polidispersão, Potencial Zeta e Eficiência de Encapsulação.

[85] Os tamanhos das partículas foram satisfatórios estando numa faixa adequada de 20 a 400 nm. O maior tamanho da NPV é proveniente da interação da matriz polimérica com a própolis vermelha. O índice de polidispersão gera informações acerca da distribuição homogênea da partícula. Os achados para esse estudo mostram que a NP e NPV (Tabela 4) apresentaram índices satisfatórios com valores inferiores a 0,3, apresentando distribuição homogênea das partículas, sendo considerado um sistema monodisperso. Observa-se ainda uma discreta melhora nesse parâmetro após incorporação da própolis a matriz polimérica. A eficiência de encapsulamento da nanopartícula de PLA com própolis vermelha de 85,4 %, levando em consideração ao teor encontrado de formononetina em análises de UPLC-DAD. Uma alta eficiência de encapsulamento, e considera-se como favorável para a utilização das nanopartículas como um produto intermediário contendo compostos fenólicos com alto poder antioxidante, sendo este uma das características essenciais para o processo de cicatrização de feridas.

Tabela 4 - Caracterização físico-química e eficiência de encapsulação das nanopartículas de NP e NPV.

Partícula	Raio hidrodinâmico das partículas (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	E.E*
NP	194,1 ± 0,082*	0,289 ± 0,024*	-11,2	-
NPV	361,2 ± 2,71*	0,239 ± 0,019*	-16,4	85,4 %

*E.E = Eficiência de encapsulação, utilizando a formononetina

[86] **EXEMPLO 4** - Caracterização morfológica das nanopartículas e membranas por MEV.

[87] Para análise da morfologia das nanopartículas (NP e NPV) e membranas (MNP e MNPV) foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura. A Figura 3 representa a fotomicrografia em diferentes tamanhos. Na Figura 3 (a),

(b) e (c), as micrografias mostram a morfologia das nanopartículas de PLA (NP) e Figura 3 (d), (e) e (f) as micrografias da nanopartícula carregada com a própolis vermelha (NPV) com aumentos respectivos de 90X, 400x e 3900X para ambas.

[88] Quando comparado a NPV com a NP, observa-se menor intensidade da formação de agregados e pode estar relacionado com o potencial zeta que apresentou menor agregação (-16,4 mV), possivelmente devido à presença de grupos funcionais do tipo ácido carboxílico com cargas negativas presente em compostos fenólicos do EHPV. Assim, permite maior dispersão entre as nanopartículas carregada com própolis vermelha.

[89] Além disso, também apresentou característica morfológica semelhante com possíveis nanopartículas na forma de nanoflocos. A Figura 4 representa as membranas poliméricas impregnadas com nanopartícula de PLA, com e sem própolis vermelha. As fotomicrografias da MNP, Fig. 4 (a), (b) e (c), foram obtidas com aumentos de 90X, 600x e 3670x respectivamente. Os mesmos parâmetros foram adotados para a MNPV Figura 4 ((d), (e) e (f)), que apresenta imiscibilidade com rugosidade mais proeminente, no entanto é possível observar aparência de maior preenchimento da matriz polimérica quando comparado com a MNP. A imiscibilidade para esse modelo de membrana torna-se importante, pois possibilita o intumescimento da matriz polimérica a base de CMC e pectina e liberação da nanopartícula favorecendo o sistema de liberação. Assim, o aspecto de rugosidades das nanopartículas na membrana é atribuído a uma repulsão entre a base da membrana de natureza hidrofílica e as nanopartículas de natureza hidrofóbica. O aumento de 3670x da MNPV (fig. 4 c), permite identificar aglomerados de nanopartícula com aspectos mais circulares devido estar revestido pela membrana.

[90] **EXEMPLO 5** - Análise termogravimétrica.

[91] As NPV e MNPV foram avaliadas quanto a degradação térmica e demonstrou estabilidade termica acentuada. A nanopartícula carregada com própolis vermelha (Figura 5) apresentou dois eventos térmicos. O primeiro evento mostra redução da estabilidade do polímero após incorporação da própolis,

possibilitando a degradação em temperatura menor do que a NP e o PLA puro. Em contra partida, a estabilidade térmica elevada do PLA proporciona maior estabilidade a própolis, favorecendo a preservação dos constituintes que nela existe. O segundo evento revela uma perda de massa em termodecomposição do PLA e de componentes majoritários da própolis vermelha. Da mesma maneira, as membranas foram avaliadas quanto a sua degradação térmica. A membrana impregnada com nanopartícula carregada com própolis vermelha (Figura 6) apresentou quatro eventos térmicos e características semelhantes a MNP. Contudo, o evento III apresentou maior perda de massa, podendo estar relacionado um aumento de degradação advindo da própolis vermelha e início da degradação da nanopartícula de PLA com a quebra da cadeia polimérica do ácido láctico, principalmente na porção éster. Já o evento IV apresentou menor perda de massa quando comparado com a MNP. Sugere-se que esse percentual trata-se do polímero PLA não ligado a própolis vermelha que sofre termodecomposição completa em temperaturas mais elevadas. O percentual residual da MNPV foi semelhante a MNP.

Reivindicações

1. Membrana polimérica incorporada com nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha **caracterizada pelo** fato de compreender:

- a) Nanopartículas de PLA (**encapsulante**) carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha preferencialmente entre 0,1 e 30 %, proveniente da própolis bruta em proporção entre 5 a 70 %;
- b) Agente espessante (**carboximetilcelulose sódica**) em proporção entre 0,5 e 10 %;
- c) Umectante (**propilenoglicol**) em proporção entre 0,1 e 10 %;
- d) Agente de estabilização (**pectina cítrica**) em proporção entre 1 e 5 %;
- e) e dispersante (**água q.s.p.**) em proporção entre 2 e 70 %.

2. Membrana polimérica incorporada com nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, conforme reivindicação 1, **caracterizada por** conter, entre seus componentes, o polímero PLA (poli-ácido láctico) bioabsorvível, biodegradável e atóxico, preferencialmente na forma nanoparticulada.

3. Membrana polimérica incorporada com nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, conforme reivindicação 1, **caracterizada por** conter entre seus componentes fitoterápicos, biotecnológicos e compostos derivados de própolis vermelha, preferencialmente extrato padronizado de própolis vermelha, para uso biotecnológico e farmacêutico de uso tópico e principalmente para uso na área farmacêutica, cosmecêutico e dermocosmética.

4. Membrana polimérica incorporada com nanopartículas de PLA carregada com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, conforme reivindicação 1, **caracterizada por** conter entre seus componentes extratos fitoterápicos, compostos farmacêuticos ativos, adjuvantes farmacêuticos potencializadores, bem como compostos derivados de própolis vermelha, preferencialmente extrato padronizado de própolis vermelha, e outros para uso tópico farmacêutico no processo de cicatrização de feridas cutâneas.

DESENHOS

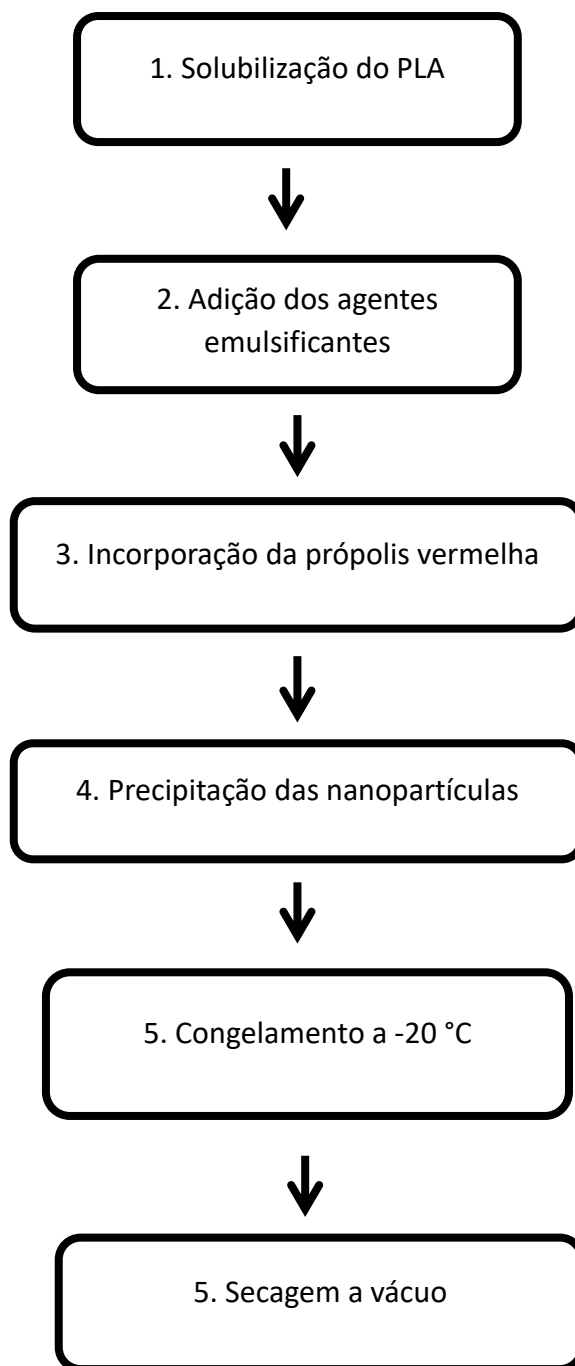


FIG. 1

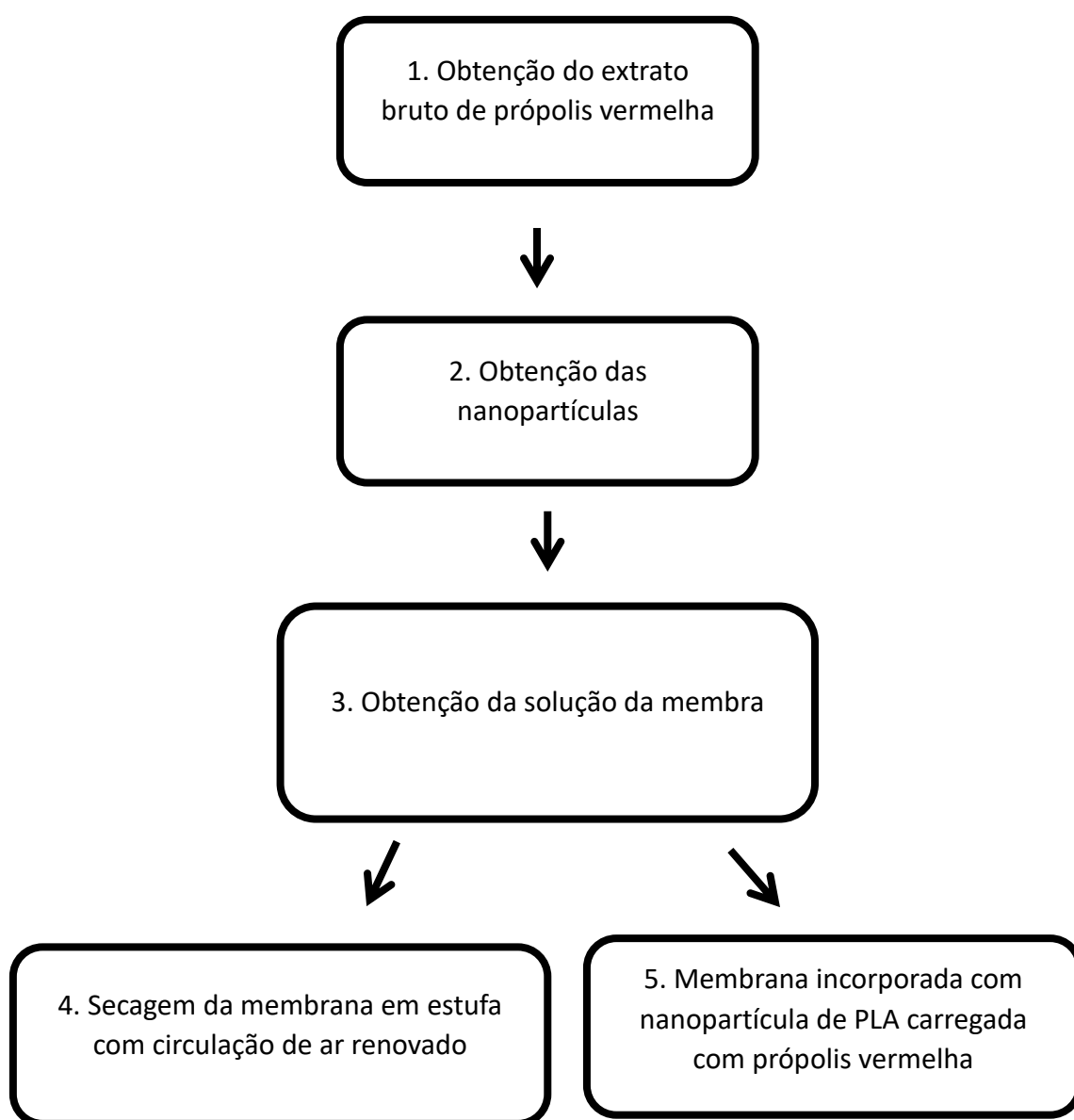
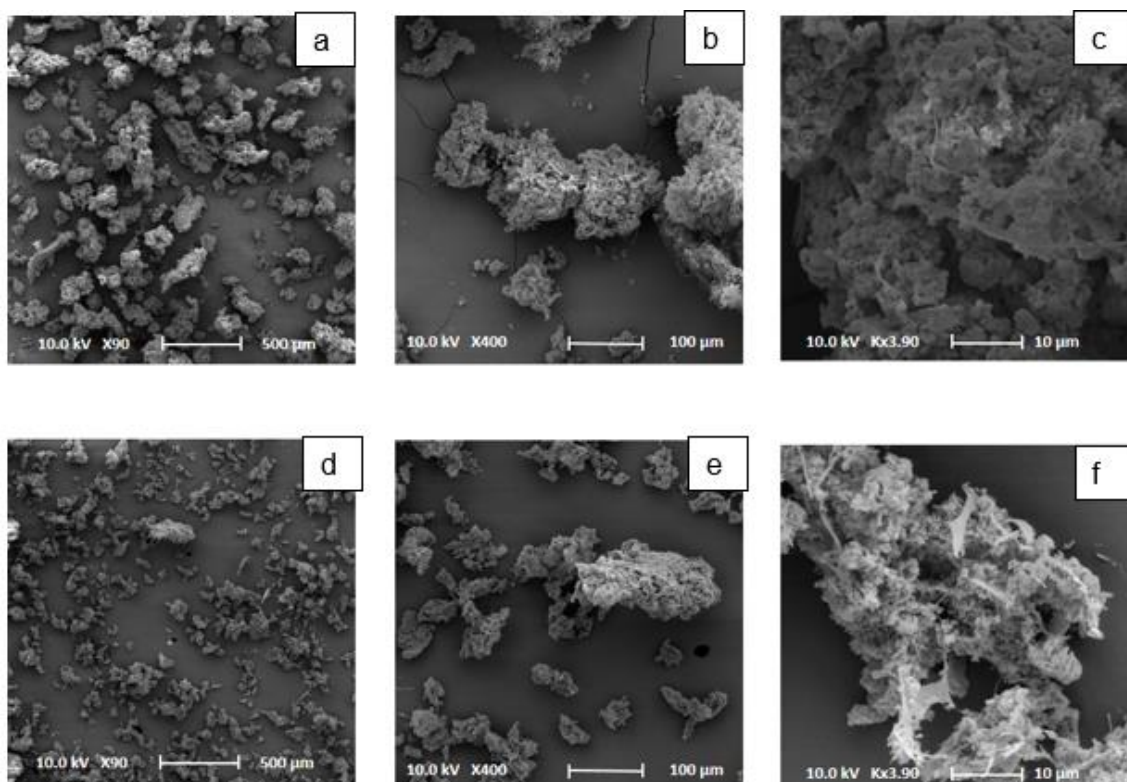
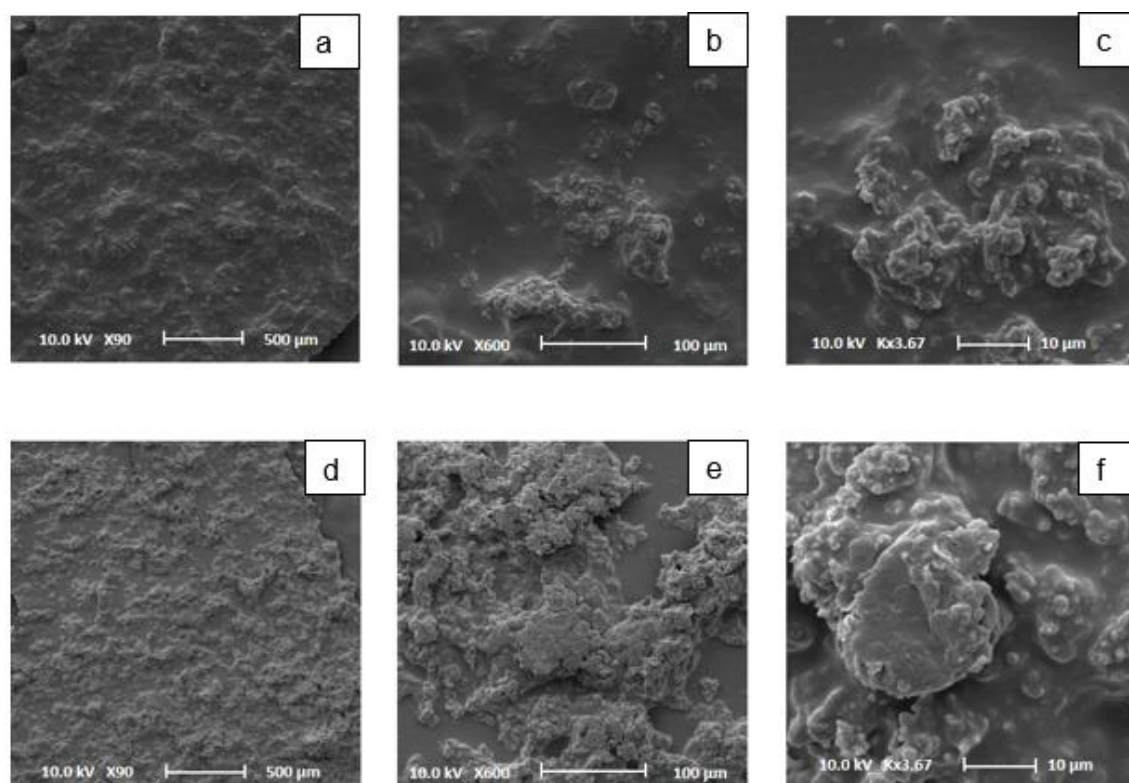


FIG. 2

**FIG. 3**

**FIG. 4**

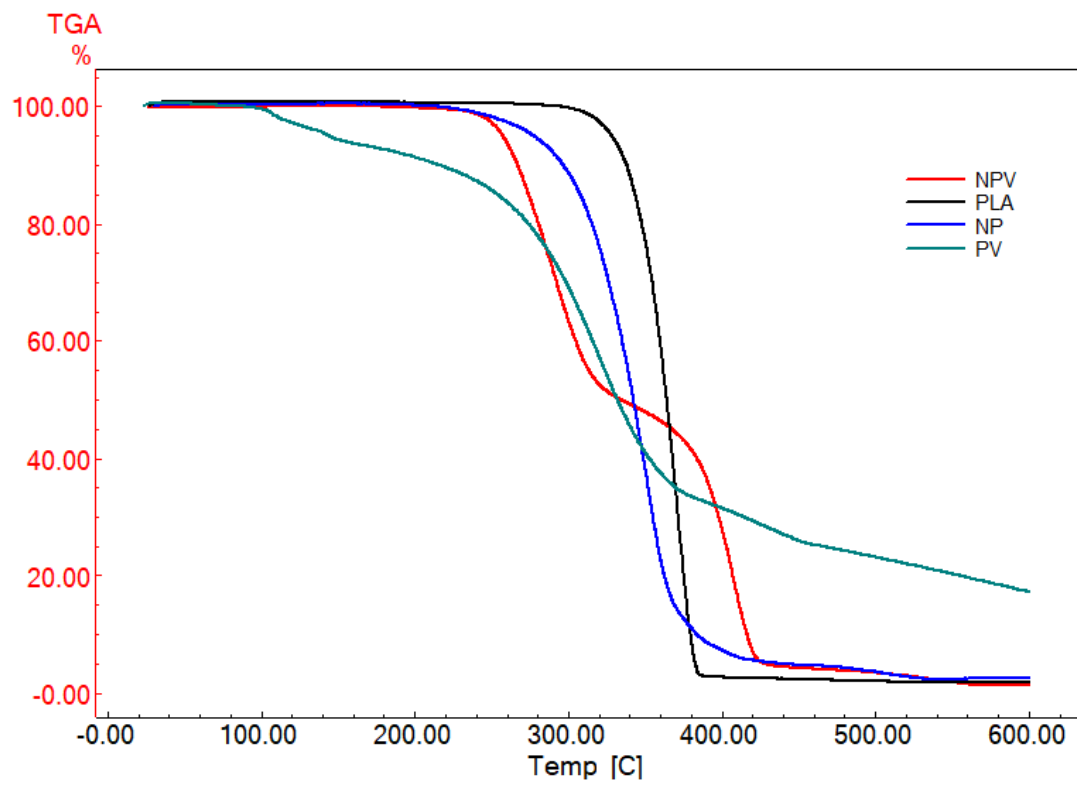
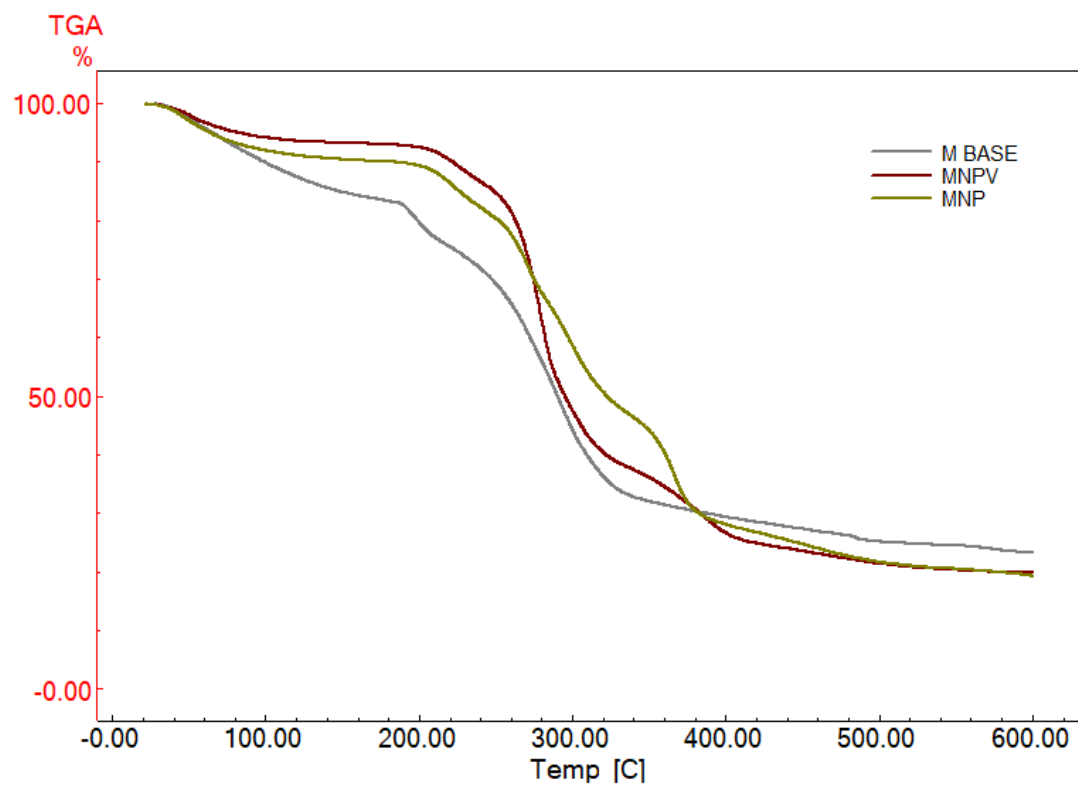


FIG. 5

**FIG. 6**