



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

CARTA PATENTE Nº BR 102017000088-5

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 102017000088-5

(22) Data do Depósito: 03/01/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 24/07/2018

(51) Classificação Internacional: A61K 35/644; A61K 9/52; A61P 29/00; A61P 31/04; A23L 21/20.

(54) Título: MICROCÁPSULAS DE CASEINATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO MICROCÁPSULAS DE CASEINATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E USOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Sociedade com intuito não econômico. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, Maceió, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira; APÍCULA FERNÃO VELHO, Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei. CGC/CPF: 02285556000105. Endereço: CHACARA ANCORA, 07, VILA GOIABEIRA, FERNÃO VELHO, Maceió, AL, BRASIL(BR), 57070-440, Brasileira

(72) Inventor: TICIANO GOMES DO NASCIMENTO; MÁRIO CALHEIROS DE LIMA; CLINSTON PAULO DE ALMEIDA; MARIO ALBERTO SANTOS DA COSTA; IRINALDO DINIZ BASÍLIO JÚNIOR; ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO; LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO; CAMILA BRAGA DORNELAS; PIERRE BARNABÉ ESCODRO; MARCOS VINÍCIUS DIAS VERMELHO; ANA FLÁVIA OLIVEIRA SANTOS; VALDEMIR DA COSTA SILVA; ADRIANA DOS SANTOS SILVA; JOSIEL SANTOS DO NASCIMENTO; JOSEALDO TONHOLO; DIEGO GOMES DOS ANJOS; MARIANA CRISTINE SANTOS DE LIMA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 03/01/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 04/02/2025

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

RELATÓRIO DESCRITIVO

“MICROCÁPSULAS DE CASEINATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO MICROCÁPSULAS DE CASEINATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E USOS”

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção na área de produtos nutracêuticos com utilidade na área da saúde humana, mais especificamente a aqueles dos sistemas de liberação imediata de princípios ativos medicamentosos e/ou nutricionais, destinados a uma administração por via oral. São propostos microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha (CSPV) também conhecidas como microcápsulas de própolis vermelha complexadas com caseína sódica que promovem a liberação imediata de flavonoides da própolis vermelha, processo de obtenção de CSPV, composições farmacêuticas contendo CSPV e usos. A produção de CSPV está ligada à utilização de tinturas hidroalcoólicas padronizadas de própolis vermelha, princípio ativo nas microcápsulas de própolis vermelha que são revestidas com caseína sódica, seguido pela técnica de *Spray-Dryer*, apresentando-se em forma de micropartículas aqui também chamados de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha. Adicionalmente, o presente pedido trata de composições farmacêuticas de liberação imediata contendo os ditos CSPV. Diante de tais atividades biológicas dos microcápsulas de liberação modificada da própolis vermelha e caseína sódica, as CSPV e as composições nutracêuticas contendo as mesmas apresentam aplicação em uma ampla gama de indústrias, como cosmética, farmacêutica, veterinária e principalmente as alimentícias, devido a suas atividades antimicrobianas e antioxidantes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[2] Os constituintes da própolis vêm sendo identificados no mundo inteiro (**Pietta, P.; Gardana, C.; Scaglianti, M.; Simonetti, P., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, V. 45, p. 390-399, 2007**). Os flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos são as principais substâncias encontradas e utilizadas para rastrear a

qualidade e, em alguns casos, para demonstrar a autenticidade da própolis de algumas regiões geográficas **(Volpi, N.; Bergonzini, G., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, V. 42, p. 354–361, 2006)**. Dentre os flavonoides e ácidos fenólicos mais comumente utilizados como marcadores, podem ser citados: quercetina, canferol, naringenina, crisina, pinocembrina, galangina (flavonoides); ácido gálico, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e derivados (ácido fenólicos), clerodanos (diterpenóides) **(Rosalen, P.L.; Castro, M. L.; Cury, J.A., Química Nova, V. 30, N. 07, 1512-1517, 2007); (Yao, L.; Jiang, Y.; Singanusong, R., Datta, N.; Raymont, K., Food Chemistry, V. 86, p.169–177, 2004); (Weston, R. J., Mitchell, K. R., Allen, K. L., Food Research International, V. 37, p. 166–174, 2004).**

[3] O uso popular cada vez crescente de própolis e seus derivados com ação antimicrobiana **(Sforcin, J.M; Fernandes Jr., A.; Lopes, C. A. M.; Bankova, V. And Funari, S. R. C., J. Ethnopharmacology, V. 73, p. 243-249, 1998)**, anti-inflamatória **(Khayyal, M.T.; el-Ghazaly, M.A.; el-Khatib, A.S., Drug Experimental and Clinical Research, V. 19, p. 197-203, 1993)**, antiviral **(Vynograd, N.; Vynograd, I.; Sosnowisky, Z., Phytomedicine, V. 7, p. 1-6, 2000)**, anticarcinogênica **(Bazo, A. P.; Rodrigues, M. A. M.; Sforcin, J.M.; Camargo, J.L.V., Ribeiro, J.L.; Salvadori, D. M.F., Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, V. 22, p. 183-194, 2002)** e imunomodulatória **(Sforcin, J. M., Kanemo, R. Funari, S. R. C., Journal of Venomous Animal and Toxins, V. 8, p. 19-29, 2002); (Sá-Nunes, A.; Faccioli, L.H., Sforcin, J. M., Journal of Ethnopharmacology, V.83, p. 93-97, 2003)** vem demonstrando o grande poder terapêutico da própolis em substituição aos medicamentos sintéticos convencionais.

[4] A caracterização de todas estas atividades biológicas associadas à tendência de utilização de produtos naturais tem resultado num aumento da demanda de própolis e produtos contendo própolis, como extratos, comprimidos, cápsulas, nebulizações ou pós **(Menezes et al., 1997).**

[5] Em se tratando da própolis vermelha, esta foi classificada como o 13° subtipo de própolis brasileira encontrada nas regiões de mangues, lagoas, rios e praias do nordeste brasileiro entre os estados da Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba pelo pesquisador **Park e col. (2007)**. A principal origem botânica da própolis vermelha se deve a planta *Dalbergia ecastophyllum*, localmente conhecida como Rabo-de-Bugio, que apresenta um exsudado resinoso vermelho liberado da sua seiva.

[6] Pesquisadores nacionais e internacionais com expertise em própolis vêm identificando os constituintes da própolis vermelha. Foram identificados 11 isoflavonóides e 1 chalcona da própolis vermelha cubana e dentre estas substâncias podemos citar: Formononetina (Biochanina B), Bichanina A, vestitol, orto-metil vestitol, medicarpina, homopterocarpina, outros derivados pterocarpanos, liquiritigenina e isoliquiritigenina (chalcona) (**Anna Piccinelli e col. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 9010-9016**). Foram identificadas também outras subclasses de flavonoides, incluindo novos tipos de flavonoides da própolis vermelha da região nordeste e que podemos citar: rutina, quercetina, luteolina, pinocembrina e biochanina A, formononetina, daidzeina, liquiritigenina, pinobanksina, dalbergina (neoflavonóides) (**Park e col. eCAM (2008) 5 (4) 435–441**).

[7] Pesquisadores estudando a própolis vermelha da região dos manguezais de Marechal Deodoro-Alagoas, identificaram o flavonóide crisina e quercetina, novos isoflavonóides na própolis vermelha de Alagoas, o vestitol, 2´4´dihidroximetoxi flavana, benzofenonas isopreniladas, bem como ácido ferúlico e ésteres fenólicos metoxieugenol, metileugenol, guiacol, ésteres dimetílicos de ácido butanenodióico, ésteres metílicos de ácido hexadecanóico (**Alencar e col. eCAM (2008) 5 (3) 313–316**).

[8] Adicionalmente, pesquisadores identificaram 14 substâncias na própolis vermelha dos manguezais de Alagoas, dentre eles triterpenos (cicloartenol, lupeol, elemicina, α -amirina e β -amirina), ácidos fenólicos (anetol, eugenol e metileugenol), isoflavonóides (isosativan, medicarpina) (**Vassya Bankova e col. eCAM (2006) 3 (2) 249–254**).

[9] Com vistas à descoberta de moléculas e seus alvos terapêuticos para cura das doenças, a própolis vermelha tem sido submetida a diversos estudos detalhados sobre suas atividades biológicas.

[10] A presença de vários flavonoides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas de própolis mostram que estas substâncias agem sinergisticamente em ação citostática/citotóxica, anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e antioxidante. Desta forma, o coquetel de substâncias combinadas, mesmo que em baixas concentrações, irá promover uma potente ação contra os agentes patogênicos. O desenvolvimento e produção de fitoterápicos e opoterápicos vêm sendo regulado no país com as resoluções que estabelecem metodologias de controle de qualidade desses produtos. Estudos de padronização do fitoterápico e opoterápicos preconizam ensaios de modo a garantir a qualidade destas classes de medicamentos desde a coleta, *screening* fitoquímico, determinação qualitativa e quantitativa de marcadores fitoquímicos, teste de autenticidade, processamento, produção, estudo de estabilidade, validação de metodologias analíticas, embalagens e controle de qualidade de produto.

[11] Desenvolvimento de novos sistemas de entrega do fármaco ou alimento funcional (nutracêutico) **(Lira, C. R. G; et al., Rev. Bras. Farm., (2009) 90 (1): 45-49)** em determinados alvos terapêuticos é uma necessidade para se obter o sucesso terapêutico ou que demonstre benefício fisiológico à saúde na prevenção de doenças, e é tão importante quanto a descoberta das moléculas com determinada ação terapêutica. Desta forma, na presente invenção foram planejadas diferentes formulações de uso farmacêutico, nutracêutico ou veterinário na forma sólida de uso preferencialmente oral e de liberação modificada.

[12] No desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos ou substâncias com atividade funcional (nutracêutico) é de extrema importância a escolha dos excipientes farmacêuticos com propriedades inertes (sem ação farmacológica ou terapêutica), sendo essenciais numa composição farmacêutica/alimentícia, pois apresentam características que asseguram estabilidade à composição, facilitam a

administração, promovem a liberação das substâncias ativas da matriz químico-farmacêutica promovendo desta forma a biodisponibilidade e consequentemente a ação farmacológica, bem como a aceitabilidade pelo consumidor.

[13] Para o desenvolvimento de sistema de liberação de fármaco/nutracêutico na forma sólida é necessário ter um conjunto de excipientes que irão liberar adequadamente o fármaco ou substâncias ativas de uma matriz farmacêutica ou alimentícia e dentre eles estão os excipientes: diluentes, aglutinantes, desagregantes, corantes, flavorizantes, edulcorantes, tensoativos ou molhantes, fluidificantes e lubrificantes. Do ponto de vista do processo e dos custos de produção, incompatibilidades farmacotécnicas entre as substâncias ativas e os excipientes devem ser evitadas. A escolha e o número de excipientes influenciam na liberação do fármaco da matriz e na absorção para os fluidos biológicos (sangue e sistema circulatório). Desta forma, o número de excipientes deve ser reduzido para o mínimo possível e deve conter somente excipientes essenciais **(Croeley, 1999; Robertson, 1999)**.

[14] Técnicas de microencapsulação são utilizadas pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias com o intuito de solucionar gargalos tecnológicos dentre eles: proteger a(s) substância(s) ativa(s) contra agentes extrínsecos (umidade, luz, oxidação) aumentando o prazo de validade do produto, prevenir a perda de substâncias voláteis, promover liberação controlada de substâncias ativas, bem como melhorar características específicas de fluidez de pós durante processos específicos de compressão de comprimidos ou no enchimento de cápsulas gelatinosas.

[15] O desenvolvimento de microencapsulados sólidos pode ser obtido pela técnica de *Spray-Dryer* (secagem por nebulização) e pode resolver alguns problemas industriais na área farmacêutica e alimentícia devido a natureza insolúvel de alguns fármacos ou presença de matrizes complexas contendo diversas substâncias com propriedades diferentes de solubilização que pode dificultar processos de absorção e consequentemente efeito terapêutico.

[16] No processo de microencapsulação os excipientes farmacêuticos são escolhidos adequadamente para promover uma parede de revestimento estável em proporção adequada que promova o encapsulamento das substâncias de interesse numa matriz de revestimento formando, dependendo do tamanho de partículas, as micropartículas ou até mesmo nanopartículas.

[17] Produtos e processos com base na própolis têm sido desenvolvidos no mundo inteiro, por diferentes grupos de pesquisas, para diferentes finalidades e de diferentes modos. Existem na literatura uma grande quantidade de composições farmacêuticas, cosméticas, higiene e limpeza, nutracêuticas, alimentos funcionais, conservantes de alimentos utilizando própolis, quitosana ou a combinação de ambos. Os documentos a seguir descrevem estas aplicações.

[18] Patente de invenção (WO/2016/066876) apresenta um compósito com atividade antimicrobiana que na sua composição é formado por três componentes formada por quitosana, compostos fenólicos de própolis e um componente manométrico de prata. Patente de invenção CN104055720 utiliza própolis, quitosana, óxido de zinco, norfloxacin, medicamentos tradicionais chineses, quitina, quitosana, mel e própolis utilizada como loção cosmética para cuidar da pele. Patente de invenção CN104001003 utilizada como um spray sublingual para diabetes é composto de várias substâncias ativas como própolis ginseng americano, ácido lipóico, extratos de plantas, amido de arroz, vinagre, quitosana e picolinato de cromo. Patente KR 201210169990.2 apresenta uma biomembrana semelhante ao um emplastro para tratamento de feridas da pele e feridas cirúrgicas composta de polivinilbutírico, goma de rosina (colophony), mais de um tipo de própolis, quitosana, além de solventes álcool e água para preparar o sistema coloidal. Patente de invenção CN102283865 compreende uma composição de quitosana e própolis com proporção entre 5 a 20 partes de quitosana e 95 a 80 partes de própolis com finalidades de reduzir a diabetes, colesterol, gordura e viscosidade do sangue. Patente de invenção KR1020110092509 constituída de veneno de abelha, própolis e quitosana apresenta atividade antimicrobiana para tratamento da mastite. Patente de invenção CN102091097 desenvolve um gel feminino de limpeza íntima composto por quitosana, extrato de

própolis, biguanidina, halogenato de bifenil éter, polímero gelificante, trietilamina, quelante, emoliente e água. Patente de invenção CN102657596 compreende uma composição com fator estimulante de células troncos da raiz capilar e dos os folículos capilares que compreende de extrato de plantas, extrato de ginseng, extrato de largato chinês, quitosana e própolis. Patente de invenção CN101690564 desenvolve um produto para tratamento e trombose a base de pó de natto, própolis, ginseng, geléia real, quitosana e outros ingredientes. Patente de invenção CN101564511 desenvolve um produto a base de uma proteína natural que compreende uma mistura de vários ingredientes naturais como pó de natto, geleia real, própolis, quitosana, balsamo, ginseng e outros ingredientes. Patente de invenção CN101559215 desenvolve líquido para reparar a pele compreende gelatina, quitosana, extrato de plantas chinesas, extratos de outras plantas chinesas, lótus, própolis. Patente de invenção KR 1020060124927 desenvolve uma preparação solúvel em água para tratamento e reparo de feridas na pele e inclui entre os ingredientes própolis e quitosana, alginatos, gelatina, carragenina, PVP, PVA, ceramidas, vitaminas A, E, C e outros ingredientes.

Patente de invenção KR1020060107232 desenvolve um medicamento fitoterápico multi-ervas que compreende diferentes extratos de plantas ginseng, própolis e quitosana. Patente CN101361907 desenvolve uma preparação hipoglicêmica e anti-hipertensiva que compreende extrato de mahogany chinês principal componente da preparação, própolis quitosana e extrato de outras plantas. Patente de invenção CN101088518 desenvolve uma preparação para reduzir ou regular a glicose sanguínea composta de própolis, ginseng, geléia real, polen, quitosana e outros extratos de planta. Patente de invenção CN1981783 apresenta uma preparação para ajustar a função imune que compreende própolis, geleia real, pólen de abelha, pupa e quitosana. Patente de invenção KR1020070043174 desenvolve uma preparação pasta dental para doenças da cavidade oral e outros órgãos compreende composição contendo antibióticos, flúor, substâncias abrasivas, xilitol, outras substâncias como própolis e quitosana. Patente de invenção KR 1020120080472 desenvolveu uma composição sólida para limpeza dos dentes composta de xilitol, sacarina, sal, flúor, sílica, perfume e adicionalmente quitosana ou própolis. Patente de invenção

CN102085370 desenvolve um spray oral anti-inflamatório para doenças da cavidade oral e compreende quitosana, extrato de própolis, lactoferrina, imunoglobulinas, lactoperoxidases, lisozimas, extrato colostro bovino, estabilizantes e substâncias aromáticas. Patente de invenção KR1020100136726 desenvolve uma pasta dental contendo diferentes ingredientes, incluindo silicatos, zeolitas, própolis e quitosana para tratamento de dor de dente, inflamação gengival e inibir crescimento de bactérias. Patente de invenção CN102920652 prepara microencapsulados de própolis com outros biopolímeros: a quitosana, hidroxipropil betaciclodextrina e glicerofosfato de sódio para tratamento de patologias periodontais. Patente de invenção RU02287323 desenvolve um fixador de dentaduras e também compreende glúcerol, hidrogel de silício, silicone, gelatina e própolis. Patente de invenção KR10200660108917 desenvolve uma pasta de dente para tratar e prevenir doenças periodontais inclui extratos de plantas, própolis, quitosana, alantoina e xilitol. Patente de invenção 100621191 desenvolve uma composição de pasta dental com ação antimicrobiana para *Streptococcus mutans* e compreende vários ingredientes incluindo polisina, própolis, quitosana, xilitol, polisorbatos. Patente de invenção KR1020030087724 desenvolve composição nutracêutica com extratos de plantas, própolis, quitina ou quitosana, extratos fermentados de plantas alho, aloe, cenoura, outros. Patente de invenção JP2003055238 desenvolve uma composição com atividade contra osteoporose e compreende cálcio, própolis e quitosana em proporções entre 8 a 32%. Patente de invenção RU 02120272 desenvolve uma composição de creme cosmético para proteção da pele durante o inverno e compreende mistura de sais, glicerina, óleos vegetais e extratos de vegetais, gel de quitosana, gel de carragena, cera de abelha, própolis.

[19] Patentes de invenção na área de alimentos funcionais, nutracêuticos e conservantes de alimentos vem sendo utilizada utilizando própolis e caseína. Patente CN 101889666 utiliza extratos de própolis e um polipeptídeo para obter alimento funcional polipeptídeo de própolis e preparar queijos com ação benéfica no aumento da imunidade, regular os níveis de açúcar no sangue e inibir crescimento de bactérias no alimento. Patente de invenção WO/2005/077349 estabelece a preparação de um

Acelerador da Beta-denfensina humana utilizando para isso vários extratos de plantas, extratos de germe de trigo, extrato de arroz, extrato de frutas (pêssego, laranja), extrato de soja, extrato de algas, soro do leite, hidrolisados de caseína, aminoácidos podendo ser utilizado com produto para cosméticos, farmacêutica, alimentos funcionais e agentes de banho. Patente KR 1020020019510 desenvolve produto alimentício auxiliar para a saúde. O produto tem uma composição a base de extrato de própolis, pós de *Monascus anka*, alcaçuz, extrato de germe de trigo, alho em pó, gengibre, banana, extrato de plantas, óxido de zinco, caseína fosfopeptídeo, vitaminas C, E, B, E, aminoácidos. A composição é utilizada para melhorar a circulação renal, funções renal e intestinal, evitar fadiga e cansaço. Patente de invenção DE 000019513540 desenvolve um produto antiflogístico de aplicação para diminuir a febre e a inflamação com extrato de própolis e caseína. Patente de invenção DE 000004320315 desenvolve produto de caseína contendo extrato de própolis com aplicação para tratar doenças do nariz, garganta, úlceras orais, gengivites, periodontites, em processos inflamatórios. Patente de invenção US 20050096262 utiliza proteínas do leite incluindo caseína e proteínas do soro do leite para inibir a proliferação de *Helicobacter pylori* e a erradicação de úlceras gástricas. Patente de invenção US 4426397 produção de um concentrado rico e produtos de abelhas como mel, polen, propolis e leite integral ou desnatado, soro do leite, carboidratos para produção de uma composição dietética para crianças, atletas de alta performance, mulheres como suplemento nutritivo.

[20] Nenhum dos documentos de patente descritos revela uma preparação contendo extrato de própolis vermelha, caseína e aerossil, métodos de caracterização do sistema encapsulante, bem como um método de dissolução para avaliar o grau de liberação das substâncias ativas das composições. Adicionalmente às características já descritas, comparando os microencapsulados obtidos no estado da técnica com os propostos pelo presente documento de patente, nenhum microencapsulados citado no estado da técnica apresentam como substância bioativa o extrato da própolis vermelha dos manguezais de Alagoas, além de não constarem de microencapsulados de liberação imediata dos princípios ativos. No presente documento, a expressão “liberação imediata” designa indiferentemente uma liberação do princípio ativo (ou

princípios ativos) que se inicia desde a colocação da preparação farmacêutica ou preparação galênica no meio de dissolução (in vitro) ou ainda uma liberação do (ou dos) princípio(s) ativo(s) que se inicia no tempo 0 até 2 horas em que percentagem varia entre 10 e 100 % ou todo o princípio ativo é liberado entre 15 minutos a 120 minutos. Outra característica inovadora destas composições é que a própolis vermelha é uma substância pobremente solúvel em água. Porém, com o uso do agente encapsulante protéico de caseína, explosol e aerosil, ocorreu a modificação das características de solubilidade do extrato de própolis vermelha assumindo característica de facilmente solúvel em água, o que foi demonstrado pelos estudos de dissolução. Desta forma, as modalidades da invenção descritas neste documento apresentam vantagens consideráveis frente ao estado da técnica.

[21] A invenção proposta no presente documento busca o preenchimento de uma lacuna tecnológica em termos da aplicação da própolis vermelha como elemento ativo de composições nutracêuticas ou farmacêuticas de liberação imediata para ser utilizado como suplemento alimentar, fortificação de alimentos sólidos, fortificação de bebidas ou no tratamento e prevenção de doenças, propondo-se uma forma de liberação imediata dos microencapsulados da própolis vermelha. Os caseinatos de própolis vermelha (CSPV) podem ainda serem utilizados na composição de alimentos funcionais, como chocolates, barra de chocolates, chocolate em pó, café expresso, café tradicional, pós de complemento vitamínico e minerais para bebidas lácteas e sucos, também como suplementos de composição de café verde e seus derivados com o intuito de fortificar a composição de compostos fenólicos e antioxidantes nestas composições, bem como na conservação dos mesmos contra bactérias e fungos. Desta forma, propõem-se caseinatos de própolis vermelha, composições com a utilização de CSPV, processos para obtenção de CSPV e usos destes produtos para preparo de medicamentos com ação antimicrobiana, antioxidante e melhoria das características sensoriais dos produtos à base de café, chocolate, café verde e chocolate e também produtos à base deste produto farmacêutico não associado a outros produtos.

[22] Cumpre salientar que, a utilização da própolis vermelha é característica determinante na inovação, em termos das tecnologias da própolis, visto que, a própolis vermelha apresenta composição característica, que, terá função primordial na atividade dos microencapsulados (caseinatos) e demais composições farmacêuticas, para prevenção e tratamento de doenças.

[23] Ainda, como diferencial essencial frente ao estado da técnica, os caseinatos de própolis vermelha e composições farmacêuticas propostos na presente invenção, utilizam compostos em uma matriz intermediária de revestimento de bioativos que contêm excipientes farmacêuticos inertes, atóxicos, de baixo custo, estáveis com característica reológica para sólidos farmacêuticos, de liberação modificada e uma matriz externa contendo excipientes farmacêuticos usuais. Desta forma, a composição aqui revelada pode ser usada para solucionar problemas técnicos semi-industriais e industriais nas áreas alimentícia e farmacêutica, bem como algumas aplicações de uso terapêutico.

[24] Em geral, os microencapsulados de própolis existentes no mercado são obtidos com excipientes diversos e que não se conhece o mecanismo de liberação (liberação imediata, liberação retardada/modificada ou ainda liberação controlada).

[25] Outro problema que se tem no mercado é que o processo de microencapsulação pode reduzir ou inativar a ação biológica dos compostos ativos presentes no extrato de própolis, fato que não ocorre com o produto aqui proposto, que mantém a ação biológica do(s) princípio(s) ativo(s). Assim, adicionalmente, os compostos ativos presentes nos CSPV apresentam mecanismo de liberação imediata, sem que haja a redução ou inativação da atividade do composto ativo em questão, presentes na própolis vermelha.

[26] Além do objetivo já destacado de propor um produto caseinato de própolis vermelha (microencapsulados de própolis vermelha) de liberação imediata à base da própolis vermelha contendo caseína, explosol e aerosil, a presente invenção propõe uma metodologia para a obtenção desses microencapsulados, composições

farmacêuticas contendo os mesmos, processos de obtenção das composições farmacêuticas e os usos para tais produtos com base na própolis vermelha.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[27] A presente invenção apresenta caseinatos de própolis vermelha um tipo de microencapsulados de liberação imediata de própolis vermelha, compostos por tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha proveniente do extrato bioativo, comlexante protéico de alta solubilidade, um promotor de fluidez e um desitegrante. Tal sistema dispersante é composto por sistema binário (dois excipientes de revestimento), que, devido a sua composição permite a liberação imediata do princípio ativo. A invenção trata também do processo de obtenção dos caseinatos de própolis vermelha, por meio da técnica de *Spray-Dryer*.

[28] Adicionalmente, apresenta-se modalidade de invenção em termos de composição contendo os microencapsulados em formulações sólidas, preferencialmente, na forma de cápsulas gelatinosas duras de liberação imediata. A composição revelada compreende i) um núcleo contendo substância(s) ativa(s) de própolis vermelha combinado com excipientes farmacêuticos; (ii) uma camada intermediária de revestimento do núcleo que pode modificar ou acelerar a liberação das substância(s) ativa(s) contidas no núcleo; (iii) uma camada externa responsável pelos processos lubrificação e fluidez e desagregação/dissolução da camada intermediária e núcleo interno. Por fim, são apresentados usos para os de liberação modificada de própolis vermelha e para as composições em questão.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS/DESENHOS

[29] A modalidade da invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser melhor explanadas e compreendidas mediante referência aos desenhos em anexo e a seguinte descrição:

[30] A **Figura 1** anexa apresenta um termograma de DTA para as composições de caseinato de própolis (CSPV) estudadas.

[31] A **Figura 2** anexa apresenta uma separação por eletroforese das isoformas α , β , κ da caseína sódica nas composições CSPV e na caseína sódica spray-dryer estudadas.

[32] A **Figura 3** anexa apresenta um espectro de FTIR-ATR para as composições de caseinato de própolis (CSPV) estudadas.

[33] A **Figura 4** anexa apresenta a Fotomicroscopia de Varredura Eletrônica de caseína Spray-Dryer (CSSD) (**A**), caseinato de própolis CSPV10% (**B**), caseinato de própolis CSPV18% (**C**), caseinato de própolis CSPV28% (**D**), caseinato de própolis CSPV35% (**E**) e caseinato de própolis CSPV50% (**F**). Fotomicrografias CSSD com ampliação de 800 vezes (escala 20 μ m); CSPV10% e CSPV18% com ampliação entre 1200 e 2400 vezes (escala 10 μ m); CSPV28%, CSPV35% e CSPV50% com ampliação entre 2000 e 2400 vezes (escala 5 μ m).

[34] A **Figura 5** anexa apresenta gráficos de perfil de dissolução para as composições de CSPV por um período de 2 horas usando velocidade de agitação de 100rpm em água destilada sem o desintegrante explosol(**A**). Os gráficos (**B**) de perfil de dissolução para as composições de CSPV28%, CSPV35% e CSPV50% por um período de 2 horas usando velocidade de agitação de 150rpm em água destilada com o desintegrante explosol (**B**).

[35] A **Figura 6** anexa apresenta halos de inibição em placa de petri de algumas composições de caseinato de própolis vermelha em diferentes diluições frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[36] 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:

Microcápsulas de caseinatos de Própolis Vermelha (CSPV)

[37] Os microencapsulados apresentados no presente documento apresentam concentrações de flavonoides, isoflavonóides, chalconas e ácidos fenólicos diferenciados devido à especificidade da própolis vermelha. Ainda, os microencapsulados são aqui chamados de caseinatos de própolis vermelha. Adicionalmente, os microencapsulados em questão apresentam importante característica de liberação imediata dos ativos, acelerando a liberação dos compostos atuantes, para uma ação mais rápida nos órgãos específicos.

[38] As composições de CSPV, além da tintura com os princípios ativos de interesse, obtidos da própolis vermelha, apresentam em sua formulação os excipientes farmacêuticos com diferentes funcionalidades sendo eles: composto ativo (tintura); encapsulante de liberação imediata uma proteína do leite animal, solúvel em água e com propriedade emulsificante; promotor de fluidez/antiaderência e um agente desintegrante.

[39] Em uma modalidade da presente invenção, um microencapsulado de liberação modificada CSPV10%, apresenta-se uma composição de: tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 5 e 15%; encapsulante de liberação modificada em proporção entre 75 a 90%, e promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 10%.

[40] Outra modalidade da invenção proposta, um microencapsulado QTPV18%, apresenta-se a seguinte composição: tintura hidroalcoólica padronizada proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 16 e 24%; encapsulante de liberação imediata em proporção entre 65 a 72%, e um promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 10%.

[41] Outra modalidade da invenção proposta, um microencapsulado CSPV28%, apresenta-se a seguinte composição: tintura hidroalcoólica padronizada proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 25 e 32%;

encapsulante de liberação imediata em proporção entre 60 a 75%, e um promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 10%.

[42] Outra modalidade da invenção proposta, um microencapsulado CSPV35%, apresenta-se a seguinte composição: tintura hidroalcoólica padronizada proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 30 e 40%; encapsulante de liberação imediata em proporção entre 55 a 65%, e um promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 10%.

[43] Outra modalidade da invenção proposta, um microencapsulado CSPV50%, apresenta-se a seguinte composição: tintura hidroalcoólica padronizada proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 40 e 60%; encapsulante de liberação imediata em proporção entre 40 a 60%, e um promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 10%.

[44] Nas modalidades da invenção, os caseinatos de própolis vermelha (CSPV), o sistema encapsulante é caracterizado por ser um sistema binário que promove a emulsificação do extrato de própolis vermelha, composto apenas por caseína sódica adicionado de dióxido de silício coloidal (aerosil) como agente de fluidez.

[45] Os microencapsulados de liberação imediata aqui chamados de caseinatos de própolis vermelha (CSPV10%, CSPV18%, CSPV28%, CSPV35%, CSPV50%), por consistir de excipientes como caseína sódica no sistema binário de emulsificação além de conferir liberação imediata ao microencapsulado ela também protege os flavonoides do extrato de própolis vermelha contra ação da luz reduzindo a processos de fotodegradação. O uso de aerosil na composição gera propriedades antiaderentes e também promove a fluidez dos pós durante etapa de produção de cápsulas gelatinosa dura.

[46] Ainda, é importante destacar que, os caseinatos de própolis vermelha propostos no presente documento apresentam-se inovadores podendo ser utilizados como nutracêuticos bem como medicamentos para atletas de alta performance e atletas de academia e também no tratamento doenças do trato gastro-intestinal como inibir o

Helicobacter pylori, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias patogênicas, e terapia complementar de tratamento do câncer e antienvhecimento por suas propriedades antioxidantes.

Processo de obtenção dos Caseinatos de Própolis Vermelha

[47] As etapas de obtenção de CSPV incluem a preparação do sistema de emulsificação contendo tintura de própolis vermelha e encapsulante de liberação imediata e agente promotor de fluidez, secagem do sistema encapsulante contendo tintura de própolis vermelha, formando os caseinatos de própolis vermelha (CSPV).

- Preparação do Extrato Bruto de Própolis Vermelha

[48] Uma amostra de 180 g de própolis é submetida a processo de extração por maceração em 400 a 750 mL de álcool 60 a 90 °GL, preferivelmente entre 70 a 85 °GL, por período de 24 a 72 horas, preferencialmente de 48 horas. O processo de extração é repetido por 3 extrações.

[49] Após a completa extração das substâncias ativas, 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 mmHg.

[50] Uma massa sólida escura será obtida com percentagem de solvente entre 2 a 35%, sendo denominado extrato bruto de própolis vermelha, livre de ceras. O extrato bruto, preferivelmente, deverá apresentar percentagem de solvente entre 2 a 6%.

[51] Um rendimento entre 50 a 75% será obtido durante o processo de extração por maceração, preferivelmente o rendimento do extrato bruto de própolis vermelha compreende uma faixa de 60 a 70%.

- Obtenção da tintura hidroalcoólica padronizada

[52] O extrato bruto de própolis vermelha (4,00 a 18,75g) com a mínima percentagem de solvente (2 a 6%) é utilizado para preparação de tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha em concentração entre 5% a 30% (p/v), preferencialmente entre 10 e 30% (p/v) e mais preferencialmente entre 15 e 25% (p/v), utilizando sistema de solvente etanol:água destilada (60:40, v/v) ou (70:30, v/v) ou (80:20, v/v) ou (90:10, v/v), ou (95:05, v/v), ou (99:01, v/v) preferivelmente entre (70:30, v/v) ou (96:04, v/v), com auxílio de agitação em banho ultrassônico por 20 minutos até completa solubilização. Nenhuma precipitação é observada após período superior a 24 horas.

- Preparação do sistema de emulsificação da caseína sódica contendo tintura de própolis vermelha

[53] Para preparação do sistema emulsificante contendo tintura de própolis vermelha são utilizados os excipientes farmacêuticos usuais com diferentes funcionalidades sendo eles: composto ativo (tintura hidroalcoólica padronizada), emulsificante com função dispersante e promotor de fluidez / antiaderência.

[54] Para preparação do sistema emulsificante contendo tintura de própolis vermelha, uma proporção entre 5 e 30% da tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha, preferencialmente entre 15 a 25% é utilizada. Esta tintura é reservada para posterior incorporação ao sistema de emulsificação da caseína sódica.

[55] O adjuvante de encapsulação (15,00 a 25,00g) para a preparação do sistema emulsivo de CSPV contendo tintura de própolis vermelha são adicionados em um recipiente contendo 350 mL de água destilada para preparar a emulsão de caseína sódica e tintura de própolis vermelha. Em seguida, o recipiente contendo a caseína sódica em água destilada é transferida para um agitador magnético com aquecimento para auxiliar a incorporação da tintura de própolis vermelha. O processo de agitação constante e com auxílio de temperatura compreendida entre 35 a 45°C, preferencialmente entre 37°C e 39°C dura em média 10 a 20 minutos. Posteriormente, a tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha preferencialmente entre 15 a 25% em volume de 200 a 250 mL é incorporada ao sistema emulsificante, seguido

pela adição de 150 mL de álcool etílico 96°GL, sob agitação constante. Nenhuma precipitação é observada neste sistema emulsificante antes da adição do aerosil numa proporção final entre 3 a 8%, preferencialmente entre 4 a 6 %. O sistema se mantém sob agitação até o processo final de secagem utilizando o spray-dryer. A percentagem de álcool etílico é equilibrada ao sistema para que a mesma apresente uma quantidade de solvente etanol:água (10:90, v/v) ou (20:80, v/v) ou (30:70, v/v) ou (40:60, v/v) ou (50:50, v/v) ou (60:40, v/v) ou (70:30, v/v) ou (80:20, v/v), preferivelmente entre 20 a 55°GL e mais preferivelmente de 45°GL contendo os adjuvantes em temperatura entre 35 e 55°C e preferencialmente entre 37 e 39°C.

[56] O sistema emulsificante ou dispersante preparado pela técnica é composto por sistema binário (caseína sódica) além de agente fluidificante (aerosil) que se mantém como sistema disperso instável com decantação na ausência de agitação. Utilizando este processo de preparação foram realizadas as preparações das composições CSPV10% (caseinato de própolis vermelha contendo 10% de tintura padronizada de própolis vermelha), CSPV18% (caseinato de própolis vermelha contendo 18% de tintura padronizada de própolis vermelha), CSPV28% (caseinato de própolis vermelha contendo 28% de tintura padronizada de própolis vermelha), CSPV35% (caseinato de própolis vermelha contendo 35% de tintura padronizada de própolis vermelha) e CSPV50% (caseinato de própolis vermelha contendo 50% de tintura padronizada de própolis vermelha).

[57] É importante destacar a importante função da caseína sódica, uma proteína láctea do leite animal solúvel em água. O sistema binário composto por caseína sódica e aerosil conferem a composição a propriedade de liberação imediata, principalmente devido as propriedades de alta solubilidade da caseína sódica em água. A baixa viscosidade da caseína sódica permite que o extrato de própolis vermelha se mantenha estável no sistema emulsificante sob agitação. O aerosil apresentou boa compatibilidade promovendo a dispersão e fluidez durante processo de secagem.

– Secagem do sistema de emulsificação obtido por gelificação contendo tintura de própolis vermelha

[57] Os sistemas emulsificante dos caseinatos contendo tintura de própolis vermelha, são então submetidos a processo de secagem em *Spray-Dryer* sob agitação constante, usando agulha injetora de 1 mm. O *Spray-Dryer* apresenta as seguintes condições de secagem: temperatura de entrada 160 a 180°C, temperatura de saída 100 a 130°C, fluxo de bombeamento 0,3 L/h e vazão de ar de 4,50 Litros.

[58] Desta forma, são obtidos pós do sistema emulsificante contendo microencapsulados de própolis vermelha e estes pós são ditos caseinatos de liberação imediata de própolis vermelha. Os sistemas emulsificantes obtidos contendo tintura de própolis vermelha, após processo de secagem em *Spray-Dryer* gera os CSPV10%, CSPV18%, CSPV28%, CSPV35% e CSPV50%.

[59] É importante destacar que, o processo de obtenção de sistema emulsificante contendo caseína sódica e outro excipiente (aerosil) formando sistema binário aqui proposto para a preparação dos microencapsulados resultará em sistema de liberação imediata que se obtêm a temperatura de 37°C pelo método de emulsificação. Ainda, o processo de preparação por emulsificação dos microencapsulados, a base de caseína sódica, apresentam como características: acelerar na liberação dos flavonoides / isoflavonóides presentes no extrato padronizado de própolis vermelha na percentagem entre 10 a 110%, e, preferivelmente entre 70 e 110% num período de 2 horas.

- Caracterização físico-química dos caseinatos de própolis vermelha (CSPV)

[60] Os caseinatos de própolis vermelha (CSPV), após processo de secagem por spray-dryer, foram caracterizadas através de diferentes técnicas analíticas para demonstrar que o extrato de própolis vermelha foi totalmente revestido pela matriz proteica. Dentre as técnicas analíticas, citamos: A) Análise Térmica Diferencial (DTA). Os caseinatos de própolis vermelha (CSPV) foram submetidos a análise térmica diferencial em sistema simultâneo DTG da Shimadzu, modelo DTG-60 sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50mL/min., numa razão de aquecimento de 10°C/min. e na faixa de temperatura entre 30-900°C. Uma quantidade de 5,0mg ± 10% foi utilizada e

colocadas em cadinho de alfa-alumina. O equipamento foi calibrado com padrões de índio e zinco. Amostras de caseína spray-dryer também foi analisada (sem extrato de própolis).

B) Gel de eletroforese dos caseinatos de própolis vermelha em poliacrilamida SDS-PAGE. A análise por eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. O gel de corrida foi preparado com 12% de acrilamida, o gel de empilhamento com 4% de acrilamida. Para preparação do gel de corrida: 2,6 mL de água destilada foi adicionada a 3,35 mL de tampão Tris com concentração de 1,5 M (concentração final de 0,5 M) e pH 8,8, adicionando posteriormente 4 mL de acrilamida a 30% (obtendo uma concentração final de acrilamida de 12%). Para aplicação das condições desnaturantes trabalhamos com 100 µL de SDS 12% (obtendo uma concentração final de 0,2%) e para polimerização do gel 100 µL de AMPS a 10% e 25 µL de TEMED. A solução foi agitada em placa magnética para uma melhor homogeneização e rapidamente vertida no sistema de montagem do gel. Para o gel de empilhamento utilizamos 3,0 mL de água destilada que foi adicionada a 1,25 mL de tampão tris (0,625 M) e pH 6,8, adicionando posteriormente 0,65 mL de acrilamida a 30% (obtendo uma concentração final de acrilamida de 4%), para conseguirmos as condições desnaturante acrescentamos a solução 50 µl de SDS (20%). Na polimerização do gel 50 µL de AMPS (10%) e 12,5 µL de TEMED. A solução foi agitada e rapidamente vertida sobre o gel de corrida e em seguida foi colocado pente para formação dos poços com capacidade de receber até 30 µL de amostra/reagente.

A preparação dos tampões se deu da seguinte forma: tampão de eletroforese (tris-glicina) 100 mM de tris:100 mM glicina mais 0,1% de SDS. O tampão de desnaturação das amostras foi preparado com 10% de β-mercaptoetanol (10 mL), 2% de SDS (4 g), 25 mL de tampão tris pH 7,4 (concentração final de 125 mM), 20 mL de glicerol (concentração final de 10%), utilizou água para ajustar a mistura para um volume de 100 mL. A corrida de eletroforese das amostras CSPV foi realizada utilizando cuba para eletroforese Vert-i10 em sistema de gel vertical com voltagem de 210 Amperes. As amostras ficaram na cuba submetidas a voltagem por cerca de 4 horas. Depois desse tempo o gel foi retirado com auxílio de uma espátula e água corrente, seguindo

com coloração. A solução de coloração foi preparada com coomassie a 0,25%; metanol 50% e ácido acético a 10% em agitação constante por cerca de 12 horas. O passo seguinte foi fazer a descoloração com solução contendo 25% de metanol e 5% de ácido acético. O gel foi revelado no equipamento FlexStation 3 Microplate Reader.

C) Espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR). Os caseinatos de própolis vermelha foram submetidos à análise FTIR-ATR na faixa de varredura entre 4000 a 400 cm^{-1} com número de scans entre 64 a 128. O equipamento utilizado foi da marca Thermo Scientific com software de aquisição Ommic. Amostras de nanopartículas poliméricas sólidas sem extrato de própolis também foram analisadas.

D) Análise da Morfologia e Diâmetro Médio das Partículas dos CSPV usando Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV). Os caseinatos de própolis vermelha (CSPV) foram submetidos a preparação de amostra em *stubs* com fita dupla de carbono ou diretamente nas lamínulas, submetidas ao sistema de metalização com filme de ouro sob corrente de 10 mA durante 7 minutos em um metalizador Sanyu Electron, modelo Quick Coater SC-701 e em seguidas analisadas em Microscópio de Varredura Eletrônico da Shimadzu, modelo SSX-550 Superscan.

E) Perfil de dissolução dos caseinatos de própolis vermelha. Os caseinatos de própolis vermelha foram submetidos a estudos de dissolução e perfil de dissolução usando um equipamento da Agilent modelo 708 DS, meio de dissolução água destilada em velocidade de dissolução de 100rpm e 150 rpm, temperatura do meio de dissolução 37°C, usando aparato Pás. As capsúlas de gelatina dura foram acondicionadas em sinkers (âncoras) contendo os caseinato de própolis vermelha para ter concentração final de 80 $\mu\text{g/mL}$ de extrato ou 16 $\mu\text{g/mL}$ do flavonóide naringenina. Realizou-se coletas de 5 mL das amostras nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos com reposição de 5 mL de água destilada. As amostras coletadas foram filtradas em filtros de papel analítico e submetidas a leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu (modelo UV-min 1240) no comprimento de onda de 280nm. Cálculo de concentração ou percentagem de dissolução foi realizada tomando como base a concentração ($\mu\text{g/mL}$) ou percentagem de dissolução do flavonóide naringenina.

F) Atividade Antioxidante usando método de DPPH. Os caseinatos de própolis vermelha e o extrato de própolis vermelha foram avaliados quanto as suas atividades antioxidantes. Preparou-se soluções estoques de 1 mg/mL das composições CSPV contendo extrato de própolis vermelha, as quais foram exatamente pesadas para obter o correspondente de 1mg/mL de extrato de própolis vermelha nestas composições e solubilizadas em sistema de solvente H₂O:etanol (3:7, v:v). Mesmo procedimento foi realizado com extrato de própolis vermelha. Alíquotas de 400µL, 50µL, 20µL e 10µL da solução estoque das NPV foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e adicionado 2 mL de uma solução etanólica de DPPH a 3mM, sendo deixadas em repouso por 30 minutos no escuro para que ocorresse a reação, e em seguida, o balão volumétrico foi aferido com etanol absoluto para obter concentrações de 80,0µg/mL, 10,0µg/mL, 4,0µg/mL e 2,0µg/mL. Mesmo procedimento foi realizado com o extrato de própolis vermelha. As amostras de extrato de própolis vermelha foram submetidas a leitura em espectrofotômetro do UV-vis em modo fotométrico ajustado para comprimento de onda de 520 nm ao final do período de 30 minutos. O sobrenadante foi submetido a leitura no espectrofotômetro UV-vis nas mesmas condições. Também foram realizadas leituras da solução de referência de DPPH 3 mM em etanol, solução de etanol absoluto para zerar o equipamento e das soluções branco (etanol absoluto + DPPH a 3 mM sem adição de extrato de própolis vermelha ou NPV) para realizar cálculo % da atividade antioxidante. O cálculo de % da atividade antioxidante foi dado pela seguinte fórmula: (%) Atividade antioxidante = $100 - (((A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100) / A_{\text{controle}})$. Onde: A_{amostra} = Absorbâncias das amostras CSPV contendo solução de DPPH, A_{branco} = Absorbâncias das amostras NPV sem a adição da solução de DPPH, A_{controle} = Absorbância da solução de referência de DPPH em etanol.

G) Atividade antibacteriana dos caseinatos de própolis vermelha. O teste de atividade antibacteriano foi realizado de acordo com o método padrão do NCCLS (2003)(Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 2003) com alguns ajustes. Usou-se o método de difusão em disco com as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os antibióticos Ciprofloxacino (5µg) e Ampicilina (10µg) foram usados como os controles

positivos para *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* respectivamente. Um Segundo disco sem antibiótico usando apenas o solvent de diluição foi utilizado com controle negativo. Então, 4 discos com diferentes concentrações foram usadas (690 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL and 140 µg/mL) para avaliar a atividade antibacteriana. Após a etapa de plaqueamento, as placas de petri foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas e 48 horas e seus halos de inibição foram medidos nestes tempos.

Composições farmacêuticas contendo CSPV

[61] As composições de CSPV obtidos podem ser utilizados em diversas composições farmacêuticas, preferencialmente como formulações sólidas, como pós, comprimidos, cápsulas gelatinosas, suplementos vitamínicos em pó, dentre outras.

[62] As composições de CSPV obtidos podem ser utilizados em diversas composições nutracêuticas e alimentícias, preferencialmente como formulações sólidas para suplementar café descafeinado, café verde, café expresso, café tradicional, café com chocolates do tipo cappuccinos; chocolates em pó para bebidas, bolos e outras receitas domésticas contendo chocolates, achocolatados, barras de chocolates, sorvetes, doces e chocolates; massas farináceas para preparação de bolos. Outras composições que necessitam de agentes emulsificantes e a base de caseína e derivados do leite.

[63] As composições de caseinato de própolis vermelha propostas no presente documento consistem em composições, preferencialmente na forma de cápsulas duras ou pós, que apresentam i) um núcleo contendo substância(s) ativa(s) de própolis vermelha combinado com excipientes farmacêuticos; ii) uma camada intermediária de revestimento do núcleo que pode acelerar a liberação das substância(s) ativa(s) contidas no núcleo; iii) uma camada externa responsável pelos processos lubrificação, diluição, fluidez, molhabilidade e desagregação/dissolução da camada intermediária e núcleo interno.

[64] É importante destacar que, nas composições de caseinatos de própolis vermelha aqui propostas os CSPV constituem o núcleo (i), com os elementos ativos da tintura de própolis vermelha, e a camada intermediária (ii), composta dos sistemas binário ou ternário constituintes dos CSPV e adjuvantes de desintegração de comprimidos ou cápsulas.

[65] Em se tratando do núcleo dessas composições de caseinato de própolis vermelha, o mesmo é formado por substâncias ativas da tintura padronizada da própolis vermelha, que estão presentes nos CSPV.

[66] A camada intermediária de revestimento do núcleo consiste de um polímero hidrofílico natural. Em uma modalidade distinta da invenção, a camada intermediária pode ser preparada também pela conjugação entre um ou mais polímero(s) hidrofílico(s) natural(is) e um ou mais polímero(s) hidrofílico(s) sintético(s). Com relação aos excipientes farmacêuticos auxiliares, como os agentes promotores de fluidez e antiaderência, aglutinantes e diluentes, utilizados na camada intermediária, estes deverão constar na camada intermediária com percentagens variáveis entre 0,05% e 95% de acordo com a sua funcionalidade na matriz farmacêutica. Em termos de proporção da camada intermediária na composição farmacêutica final, a camada intermediária de revestimento do núcleo deve apresentar percentagens entre 5% e 95%, e preferencialmente entre 5 e 80% em relação ao peso total da composição.

[67] Já a camada externa da composição consiste de excipientes farmacêuticos com diversas funcionalidades, dentre eles citamos diluentes, lubrificantes, agentes promotores da fluidez, molhantes, desintegrantes, super-desintegrantes, cuja dissolução da composição é promovida pelo contato dos líquidos do trato gastrointestinal (TGI) com as micropartículas de liberação imediata. O mecanismo de liberação imediata acontece quando o sistema matricial composto por caseína sódica, aerosil e extrato seco de própolis vermelha entram em contato com os líquidos do TGI, principalmente a água e sais gastrointestinais promovendo erosão e dissolução das micropartículas sólidas em que estão contidas as substâncias bioativas (flavonoides, isoflavonóides e compostos fenólicos), as quais irão ser liberados num período de 120

minutos com mecanismo de liberação por difusão seguido por liberação dos constituintes ativos. Outros fatores com a liberação das substâncias ativas destas matrizes de liberação como: ação de fatores fisiológicos do TGI como, líquidos circulante, variação de pH, peristaltismo, grau de ionização (solubilização) e/ou precipitação das substâncias ativas, entre outros.

[68] Em termos de porcentagens dos excipientes farmacêuticos na camada externa, estes podem representar entre 0,01% e 100% do peso total da camada externa, de acordo com a sua funcionalidade na matriz farmacêutica. Em termos de proporção da camada externa na composição farmacêutica final, a camada externa da composição deve apresentar porcentagens entre 0,01% e 90%, preferencialmente entre 1 e 85% em relação ao peso total da composição.

[69] A composição farmacêutica aqui apresentada pode ou não apresentar invólucro de gelatina, formando cápsulas duras ou moles. Assim, em uma modalidade da invenção aqui proposta, podem-se obter cápsulas com invólucro de gelatina em tamanhos compreendidos entre 000 e 03 com coloração escura.

[70] Em outra modalidade de invenção, as composições de caseinatos de própolis vermelha podem ser utilizadas na sua forma original contendo o sistema matricial binário (caseína sódica e aerosil) ou contendo o sistema matricial ternário (caseína sódica, aerosil e explosol) a serem incorporados em um novo sistema matricial caféico usando como suplemento em cafés expresso, café tradicional, composição de café verde, composição de café cappuccino, café aromáticos, dentre outras.

[71] Em outra modalidade de invenção, as composições de caseinatos de própolis vermelha podem ser utilizadas na sua forma original contendo o sistema matricial binário (caseína sódica e aerosil) ou contendo o sistema matricial ternário (caseína sódica, aerosil e explosol) a serem incorporados em composições a base de chocolates usando como suplemento em barra de chocolates, achocolatados, pós de chocolates para bebidas lácteas, pós com complemento vitamínico e minerais para bebidas lácteas ou sucos, dentre outras.

[72] Ainda, os excipientes farmacêuticos ou alimentícios utilizados na composição podem ser de diversos tipos e em formulações diversas, com composições variáveis entre os diversos tipos de excipientes. Entre os excipientes usados nas composições, têm-se polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos como gelatina, amido de milho, amido pré-gelatinizado, gomas xantana, maltodextrina, pectina, estearato de magnésio, talco, dióxido de titânio, polivinilpirrolidone, carbômeros, carbapol, polivinil álcool, polaxâmeros, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, glicolato de amido sódico (explosol), laurilsulfato de sódio, celulose, celulose microcristalina, e derivados da celulose, como CMC, metilcelulose e hydroxipropiletilcelulose.

Processo de obtenção de composições farmacêuticas/ nutracêuticas contendo caseinatos de própolis vermelha (CSPV)

[73] As etapas de obtenção de composições farmacêuticas ou nutracêuticas contendo CSPV podem ser identificadas pelos seguintes passos principais: obtenção de microencapsulados de liberação imediata de própolis vermelha, realização de misturas físicas para garantir teor e uniformidade de conteúdo e preparação das cápsulas de própolis vermelha em invólucro de gelatina dura.

[74] As composições de CSPV obtidos podem ser utilizados em diversas composições farmacêuticas, nutracêuticas ou alimentos funcionais, preferencialmente como formulações sólidas, como pós, comprimidos, cápsulas gelatinosas, dentre outras.

[75] Preferencialmente, para a preparação de cápsulas gelatinosas duras contendo CSPV, os microencapsulados são submetidos a processo de determinação da uniformidade de conteúdo para avaliar as variações no teor dos microencapsulados em relação ao valor teórico. Em seguida, são submetidos a processo de mistura pelo método de diluição geométrica com os excipientes do tipo diluente em proporção entre 0,5 e 80% (preferivelmente entre 1 a 60%, e mais preferivelmente entre 1 a 50%) num tempo compreendido entre 5 e 120 minutos, mais preferivelmente entre 25 e 65 minutos. A mistura foi finalizada adicionando um excipiente tipo lubrificante em

proporção entre 0,1 e 6%, preferivelmente entre 0,3 a 4%; mais preferivelmente entre 0,25 e 1%, em um período de 2 a 10 minutos, mais preferivelmente entre 3 e 5 minutos.

[76] A encapsulação pode ser realizada em instrumentos manuais (tablado para encapsulação), instrumentos semi-industriais e industriais, ajustando a massa do CSPV em termos da tintura padronizada de própolis vermelha. Variações entre 90 a 110% do teor da tintura padronizada de própolis vermelha. Variações entre 85 a 115% em termos de uniformidade de conteúdo da tintura padronizada de própolis vermelha. Variações entre 75 e 115% da percentagem de dissolução para os flavonoides majoritários da tintura padronizada de própolis vermelha.

[77] Preferencialmente, para a preparação de composições nutracêuticas, alimentos funcionais, produtos caféicos, produtos lácteos e preparação contendo chocolate, os microencapsulados de caseinatos de própolis vermelha são submetidos a processo de determinação da uniformidade de conteúdo para avaliar as variações no teor dos microencapsulados em relação ao valor teórico. Em seguida, são submetidos a processo de mistura pelo método de diluição geométrica com os outros ingredientes majoritários (café, leites, chocolates) em proporção entre 0,5 e 80% (preferivelmente entre 1 a 60%, e mais preferivelmente entre 1 a 50%) num tempo compreendido entre 5 e 120 minutos, mais preferivelmente entre 25 e 65 minutos.

Usos de composições de caseinato de própolis vermelha

[78] Diante de tais atividades biológicas dos caseinatos de liberação imediata da própolis vermelha, estes podem ser utilizados em uma ampla gama de setores industriais, como cosmético, farmacêutico, nutracêutico, alimentício e veterinário.

[79] A utilização da própolis como princípio ativo na prevenção e tratamento de diversas doenças já é amplamente descrito. Entretanto, a própolis vermelha apresenta composição diferenciada das demais própolis já amplamente descritas no estado da técnica, o que indica atividades fisiológicas variadas.

[80] A própolis vermelha apresenta atividades biológicas antibacterianas para as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, com inibição do crescimento bacteriano, quando submetido tanto à tintura da própolis vermelha, quanto aos caseinatos da própolis vermelha.

[81] Devido à sua característica biológica comprovadamente antibacteriana, os microencapsulados de liberação imediata e composições farmacêuticas e nutracêuticas obtidas pelos processos propostos podem ser utilizados para: tratamento de infecções bacterianas de amplo espectro de ação, tratamento de diarreias causadas por bactérias com *Salmonella sp*, *E. coli*, bem como *S. aureus*, tratamento de estomatites, gastroenterites, enterites, enterocolites causadas por bactérias gram positivas ou negativas de origem alimentar, tratamento de úlceras originadas de gastrites e enterites como a colite ulcerativa, enterites ulcerativas e estomatites ulcerativas, tratamento de úlceras periodontais e úlceras orais; tratamento de processos inflamatórios de origem bacteriana; tratamento de processos inflamatórios e infecciosos em geral. Tais usos para o produto aqui propostos, em termos de aplicação de caseinatos de própolis vermelha, apresentam-se como um diferencial frente ao já exposto pelo estado da técnica.

[82] Assim, as modalidades da invenção descritas no presente documento apresentam-se como um avanço no estado da técnica já que, permitem a produção de CSPV, composições farmacêuticas e nutracêuticas contendo os mesmos de maneira economicamente viável. Desta forma, os caseinatos de própolis vermelha obtidos através do processo proposto podem ser utilizados, isolada ou em composição com outros produtos, em diversos setores industriais, como alimentício, cosmético e farmacêutico.

EXEMPLOS

[83] As avaliações dos CSPV obtidos utilizando o processo proposto demonstraram a obtenção de um produto adequado, puro e de atividade preservada. Os resultados obtidos estão representados nas figuras indicadas.

[84] EXEMPLO 1 – Termograma de DTA para as composições estudadas de CSPV.

[85] Análise térmica foi realizada em equipamento TG/DTA Shimadzu DTG 60H em atmosfera de ar sintético com fluxo 50mL/min, razão de aquecimento de 10°C/min. numa faixa de temperatura entre 30 a 900°C. Foram pesadas massas de (~10 mg + 10%) de cada amostra e transferida para um cadinho de alumínio. As curvas DTA mostraram transições de fase para o encapsulante caseína sódica entre 40 e 75°C (correspondente ao desprendimento de umidade e água de constituição), entre 210 e 600°C (correspondente à decomposição desta proteína láctea). O extrato de própolis vermelha apresentou transição de fase em 100°C, bem como transições de fase entre 300 e 450°C (pico endotérmico de decomposição) e entre 450 e 600°C (pico exotérmico de decomposição). As composições de caseinato de própolis vermelha apresentaram perfil calorimétrico diferencial semelhante ao excipiente caseína sódica na faixa de temperatura entre 210 e 600°C o que demonstra encapsulação do extrato pelo agente encapsulante caseína sódica formando os caseinatos de própolis vermelha.

[86] Os dados mostraram perfis calorimétricos semelhantes entre o agente encapsulante de revestimento (caseína sódica) e extrato ativo de própolis vermelha sugerindo que os caseinatos apresentaram compatibilidade térmica e estabilidade térmica (**Figura 1**).

[87] EXEMPLO 2 - anexa apresenta separação em gel de eletroforese em poliacrilamida SDS-PAGE para as composições de caseinato de própolis vermelha.

[88] A técnica de eletroforese utiliza do processo de separação por peso molecular e foi aplicada com o intuito de avaliar o comportamento da caseína após processo de secagem com microencapsulação dos flavonoides presentes no extrato de própolis vermelha com caseína. O gel de poliacrilamida revela as bandas entre 24 e 30 KDa correspondem as isoformas de caseína α s2, κ , β e α s1 que possuem peso molecular de 23, 24, 25 e 30 KDa, respectivamente. O gel de eletroforese mostrou que as isoformas de caseína (α s1, κ , β) mostrando que a encapsulação dos flavonoides da

própolis mantiveram as suas integridades físicas das isoformas de caseína sem processo de desnaturação. O mecanismo mais aceito é a formação de complexos quelantes dos flavonoides com os aminoácidos presentes na caseína em porções hidrofóbicas da estrutura molecular da caseína são explicadas (**Figura 2**). O não aparecimento da banda em 23 KDa pode explicar a interação dos flavonoides na porção da isoforma α s2 da caseína sódica.

[89] EXEMPLO 3 - anexa apresenta um espectro de FTIR-ATR para as composições de caseinato de própolis vermelha.

[90] A amostra, previamente seca, foi misturada ao KBr e depois compressa em uma “pastilha de KBr” utilizando-se uma prensa manual. As medidas foram feitas através de um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10, em modo Smart Omni- Transmission Infrared Fourier Transform Spectroscopy (SOSIFT). Utilizou-se a faixa de número de onda 4000 a 400cm⁻¹ por transmitância em percentagem que estão relacionados aos estiramentos na região do infravermelho próximo e número de scans de 32 a 64.

[91] O espectro de infravermelho do extrato de própolis vermelha, mostra a presença da deformação axial –OH larga em 3336 cm⁻¹, hidroxila típica de fenóis, também apresentou a banda de absorção em 2970 cm⁻¹ de CH₃ e CH₂, em 2932 cm⁻¹ referente à deformação axial de CH₃ e as bandas de absorção 1617 cm⁻¹, 1496 cm⁻¹ e 1450 cm⁻¹ decorrentes de C=C de anéis aromáticos e em 1045 cm⁻¹ houve a presença da banda intensa de deformação axial de C-O, a banda de absorção em 877 cm⁻¹ mostrou a deformação angular C-H fora do plano característica de compostos aromáticos. A presença de aromáticos numa amostra é verificada pela existência de bandas mais importantes na região de baixa frequência entre 900 e 675 cm⁻¹.

[92] O espectro FTIR-ATR da caseína sódica e caseína sódica Spray-Dryer apresentaram estiramentos em 3455cm⁻¹, 1661cm⁻¹, 1530cm⁻¹ e 1250cm⁻¹ referente aos grupos funcionais de N-H de NH₂ (amina) e H-N-C=O de (amida) e C=O de (amida) presentes na caseína de diversos aminoácidos (lisina, triptofano, metionina, isoleucina, cistina, fenilalanina, valina). A caseína é considerada uma

fosfoproteína e também apresentou estiramentos na região de 1089cm^{-1} e 547cm^{-1} do grupo (PO_4^{---}).

[93] As composições de caseinatos de própolis vermelha (CSPV10%, CSPV18%, CSPV28%, CSPV35% e CSPV50%) apresentaram os mesmos estiramentos e deformações axiais e angulares característicos do agente encapsulante (caseína sódica). A caracterização na região do espectro de infravermelho dos microencapsulados de caseinato de própolis vermelha mostraram bandas de absorção características em 3455cm^{-1} , 1661cm^{-1} , 1530cm^{-1} , 1250cm^{-1} , 1089cm^{-1} e 547cm^{-1} (Figura 3).

Semelhantes ao agente encapsulante caseína sódica demonstrando a encapsulação do extrato de própolis vermelha (Figura 3).

[94] EXEMPLO 4 – Ensaios de microscopia eletrônica de varredura dos caseinatos de própolis vermelha (CSPV10%, CSPV18%, CSPV28%, CSPV35% e CSPV50% carregados com extrato da própolis vermelha de Alagoas).

[95] A morfologia dos caseinatos de própolis vermelha (CSPV) obtidos por *Spray-Dryer* foram avaliados com um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os pós foram fixados a uma fita adesiva dupla-face, em seguida foram metalizados com 3 minutos em platina e 5 minutos em ouro usando um metalizador Sanyu Electron, modelo Quick Coater SC-701, usando corrente de 10mA, sob vácuo. As amostras foram analisadas com um microscópio eletrônico de varredura, Shimadzu, modelo SXX-550 Superscan (Tóquio, Japão) operado a 15 kV amplificação de até 2400 vezes.

[96] O ensaio de microscopia eletrônica de varredura foi utilizado para comprovar que as micropartículas dos chamados caseinatos de própolis vermelha obtidas por *Spray-Dryer* também chamadas de microesferas ou também chamados de microencapsulados. Os resultados mostram que as partículas em modelo bimodal a polimodal que apresentam tamanho entre $2\text{ }\mu\text{m}$ e $8\text{ }\mu\text{m}$, esféricas, ausência de fissuras ou porosidades, lisas e uniformes indicando formação de filme contínuo na parede externa. Na formulação CSPV50%, que possuía a maior concentração de extrato de própolis, não foi observada a presença de partículas de conformação de agregados

(**Figura 4**). Os caseinatos apresentaram-se em sua maioria turgidos com aspecto irregular e também partículas esféricas com tamanhos variados, mas ausência de fissuras na superfície.

[97] EXEMPLO 5 - anexa apresenta gráfico de perfil de dissolução para composições de CSPV por um período de 2 horas.

[98] Os testes de dissolução foram realizados utilizando o dissolutor Agilent 708 DS, velocidades de agitação de 100 e 150 rpm a 37°C em quatro amostras (CSPV18%, CSPV 28%, CSPV35% e CSPV50%), em água destilada como meio de dissolução e aparato pá. Os perfis de dissolução foram obtidos a partir da análise em espectrofotômetro UV-mini 1240 Shimadzu. Os tempos de coleta foram de 15min., 30min., 60min., 90min. E 120min. de dissolução, no qual coletou-se 5 mL do meio de dissolução com reposição e, em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro analítico. As amostras filtradas foram analisadas em espectrofotômetro UV-vis em comprimento de onda de 280nm. A curva de calibração foi realizada com o flavonóide naringenina utilizado para obtenção dos microencapsulados na faixa de concentração de 1; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 µg/mL.

[99] O perfil de dissolução de CSPV10%, CSPV18%, CSPV28%, CSPV35% e CSPV50% foram realizados usando meio de dissolução água destilada por um período de 2 horas usando velocidade de agitação 100rpm sem o uso de desintegrante explosol(primeira condição de simulação) (**Figura 5, Gráfico A**). Os perfis de dissolução das composições CSPV18%, CSPV28%, CSPV35% e CSPV50% em água destilada por 120min apresentaram percentagens de dissolução de 11,51%±8,89, 16,32%±9,38, 30,95 de dissolução em 360 minutos e QTPV75 se dissolveu 36,58%±29,59, 44,67%±24,86 em 120 minutos.

[100] O perfil de dissolução de CSPV28%, CSPV35% e CSPV50% também foram realizados usando meio de dissolução água destilada por período de 2 horas, com velocidade de agitação de 150rpm e com o uso do excipiente desintegrante explosol (segunda condição de simulação). Na segunda condição, após 120min, observou-se

que a composição CSPV28% ($91,92\% \pm 3,41$) e CSPV35% ($108,25\% \pm 7,56$) se dissolveu em maior quantidade em relação à CSPV50% ($70,52\% \pm 2,72$) (**Figura 5, Gráfico B**). Outro fato importante que usando o desintegrante explosol conseguiu-se reduzir a variabilidade entre as cápsulas (8 unidades) obtendo-se menor desvio padrão. Pelos perfis de dissolução rápido obtidos pode-se observar também que estas composições são de liberação imediata. O sistema matricial de caseinato de própolis vermelha está atuando como um sistema que aumenta a solubilidade e consequentemente a velocidade de dissolução dos flavonoides do extrato de própolis vermelha.

[101] EXEMPLO 6 - A Tabela I apresenta os resultados de atividade antioxidante (%) usando método DPPH do extrato de própolis vermelha e dos caseinatos de própolis vermelha.

Composição	% de Atividade Antioxidante			
	80µg/mL	10µg/mL	4µg/mL	2µg/mL
EPV	98,06±0,18	79,00±0,13	45,73±0,03	32,97±0,04
CSPV50%	95,90±0,17	63,22±0,06	55,23±0,10	47,21±0,11
CSPV35%	95,87±0,42	63,48±0,05	48,98±0,11	44,52±0,05
CSPV28%	98,37±0,17	79,93±0,12	79,19±0,18	68,91±0,34
CSPV18%	100,87±0,11	80,73±0,42	73,65±0,18	69,97±0,20
CSPV10%	100,37±0,06	82,39±0,03	72,02±0,16	67,05±0,06

[102] Nas concentrações de extrato de própolis vermelha de 80 e 10µg/mL, os caseinatos CSPV mostraram atividade antioxidante entre 95,87 a 100,87% e nas concentrações de 4 e 2µg/mL, as composições de CSPV apresentaram percentagem de atividade antioxidante entre 79,19 e 44,52% e, portanto, muito superior ao extrato de própolis vermelha entre 45,73% e 32,97%. Os caseinatos de própolis vermelha apresentaram, portanto, boa atividade antioxidante. As composições CCSPV28%, CSPV18% e CSPV10% apresentaram melhores atividades antioxidantes.

[103] EXEMPLO 7 Ensaio de atividade antimicrobiana dos caseinatos de própolis vermelha em diferentes diluições frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pelo método de difusão em ágar (Tabela II e Figura 6).

[104] Tabela II. Atividade antibacteriana dos caseinatos de propolis vermelha usando técnica de difusão de disco contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Amostra	Concentração (µg/poço)	Halos de inibição (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CSPV28%	695	24	15
	500	22	19
	250	21	19
	140	20	8
CSPV35%	695	20	21
	500	19	15
	250	21	14
	140	20	14
CSPV50%	733	20	15
	500	19	14
	250	21	14
	140	19	14

[105] Os resultados dos caseinatos de própolis vermelha CSPV28%, CSPV35% e CSPV50% demonstraram atividade antibacteriana pela formação de halo de inibição maior que 19 mm de diâmetro contra o microorganismo *Staphylococcus aureus* e halos maior que 8 mm de diâmetro contra o microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*.

REIVINDICAÇÕES

1. Microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha caracterizadas por compreender a) os flavonóides e isoflavonóides derivados da própolis vermelha, b) caseína sódica e, c) dióxido de silício coloidal.
2. Microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme a reivindicação 1, caracterizadas por apresentar os princípios ativos: flavonoides, isoflavonóides, chalconas e ácidos fenólicos específicos e derivados de extratos da própolis vermelha, e por apresentar porcentagem final de extrato de própolis vermelha entre 10 e 50%.
3. Microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender:
 - a) tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferencialmente entre 5 e 30%;
 - b) Caseína sódica, como encapsulante proteico derivado lácteo em proporção entre 55 e 90%;
 - c) e promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 6%.
4. Microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 3, caracterizado por compreender sistema dispersante composto por sistema binário de caseína sódica e dióxido de silício coloidal.
5. Microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 1 a 4, caracterizado por apresentar propriedades antiaderentes.
6. Microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 1 a 5, caracterizado por apresentar propriedades de liberação imediata.

7. Microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado por conter, entre seus componentes, compostos da classe dos flavonóides e isoflavonóides derivados de extrato de própolis vermelha, no tratamento de infecções bacterianas, causados, preferencialmente, por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

8. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- i) Preparação do extrato bruto a partir da própolis vermelha in natura;
- ii) Preparação da tintura hidroalcoólica padronizada a partir do extrato bruto da própolis vermelha, preparado em i);
- iii) Preparação do sistema de emulsificação com uso de proteína láctea contendo tintura obtida em ii);
- iiii) Secagem do sistema de emulsificação obtido em iii) e formação dos microencapsulados de própolis vermelha;
- iiiii) Caracterização das microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha usando técnicas de: Calorimetria exploratória diferencial (DSC), eletroforese em gel de poliacrilamida, Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), atividade antioxidante e atividade antibacteriana.

9. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa i), uma amostra de própolis ser submetida à completa extração das substâncias ativas, com álcool 60 a 90 °GL, preferencialmente entre 70 a 85 °GL, seja por maceração, com posterior concentração em rotaevaporador ou banho-maria e obtenção de material com porcentagem de massa sólida solúvel livre de ceras.

10. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa ii), o extrato bruto é solubilizado em solvente etanol:água destilada (60:40, v/v) ou (70:30, v/v) ou (80:20, v/v) ou (90:10, v/v), preferencialmente entre (70:30, v/v) ou (80:20, v/v), para obtenção de tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha em concentração entre 5% a 30% (p/v), preferencialmente entre 10 e 30% (p/v) e mais preferencialmente entre 10 e 25% (p/v).

11. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iii), para a preparação dos sistemas emulsivos binários contendo a tintura da própolis vermelha serem utilizados: composto ativo (tintura hidroalcoólica padronizada), emulsificante protéico e de origem láctea e promotor de fluidez / antiaderente.

12. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iii), para preparação do sistema emulsificante, são adicionados, sob agitação, sistema dispersante binário composto de caseína sódica e dióxido de silício coloidal.

13. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 11 e 12, caracterizado pela adição de sólidos em proporção entre 20% a 50% de sistema dispersante, proporção de sólidos entre 45 a 80% da tintura hidroalcoólica padronizada contendo sistema de solvente etanol:água (90:10, v/v) ou (85:15, v/v) ou (80:20, v/v) ou (70:30, v/v) ou (60:40, v/v) ou (50:50, v/v) e preferivelmente entre 60 e 90 °GL, sob temperatura preferencial entre 30 °C e 45 °C e mais preferencialmente entre 37 °C e 39 °C.

14. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iii), o sistema emulsificante contendo tintura de própolis vermelha, são submetidos a processo de secagem em *Spray-Dryer* para obtenção de microencapsulados sendo as condições de secagem, preferencialmente, agitação constante, agulha injetora

de 1 mm, temperatura de entrada de 155 a 180°C, temperatura de saída de 105 a 120°C, fluxo de bombeamento 0,3 L/h e vazão de ar de 4,50 Litros.

15. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iiiii) comprova-se o revestimento das nanopartículas poliméricas contendo extrato de própolis vermelha usando calorimetria exploratória diferencial (DSC), Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

16. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iiiii) comprova-se a integridade do agente encapsulante proteico contendo extrato de própolis vermelha usando eletroforese em gel de poliacrilamida.

17. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iiiii) comprova-se a microencapsulação dos caseinatos de própolis vermelha com tamanho de partículas entre 5 e 22 μm .

18. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iiiii) comprova-se a atividade antioxidante dos microencapsulados contendo extrato de própolis vermelha usando métodos de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

19. Processo de obtenção de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de, na etapa iiiii) comprova-se a atividade antibacteriana dos microencapsulados contendo extrato de própolis vermelha usando método de difusão em disco.

20. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 1 a 3, caracterizada por compreender microcápsulas de

caseinatos de própolis vermelha como princípio ativo, isoladamente ou em conjunto com outros ativos.

21. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicação 20, caracterizada por ser preferencialmente formulações sólidas como pós, comprimidos, cápsulas, dentre outras e, mais preferencialmente, na forma de cápsulas gelatinosas.

22. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 e 21, caracterizada por compreender (i) um núcleo contendo substância(s) ativa(s) de própolis vermelha combinado com excipientes farmacêuticos; (ii) uma camada intermediária de revestimento do núcleo que pode modificar ou retardar a liberação das substância(s) ativa(s) contidas no núcleo; (iii) uma camada externa responsável pelos processos lubrificação, diluição, fluidez, molhabilidade e desagregação/dissolução da camada intermediária e núcleo interno.

23. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20, 21 e 22, caracterizada por apresentar característica de liberação imediata.

24. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20, 21 e 22, caracterizada por apresentar ou não invólucro de gelatina.

25. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20, 21 e 22, caracterizada por compreender um núcleo (i) composto pelas substâncias ativas da própolis vermelha, derivadas da tintura padronizada da própolis vermelha e excipientes farmacêuticos.

26. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20, 21 e 22, caracterizada por compreender uma camada intermediária (ii) composta por excipientes farmacêuticos, preferencialmente

agentes emulsificante protéico, promotores de fluidez e antiaderência, na porcentagem entre 0,05% e 95% do peso total da camada intermediária, de acordo com a funcionalidade do excipiente farmacêutico na matriz farmacêutica e, apresentar proporção entre 0,05% e 95%, preferencialmente entre 0,10 e 85%, em relação ao peso total da composição.

27. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20, 21 e 22, caracterizada por compreender uma camada externa (iii) cuja dissolução é promovida pela alta solubilidade do encapsulante protéico em água e com auxílio de excipientes farmacêuticos, com diversas funcionalidades, preferencialmente diluentes, lubrificantes, agentes promotores da fluidez, molhantes, desintegrantes, super-desintegrantes, na porcentagem entre 0,05% e 100% do peso total da camada externa, de acordo com a funcionalidade do excipiente farmacêutico na matriz farmacêutica e, apresentar proporção entre 0,01% e 50%, preferencialmente entre 1 e 15%, em relação ao peso total da composição.

28. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20, 21 e 22, caracterizada por compreender um polímero hidrofílico natural ou combinação de mais de um polímero(s) hidrofílico(s) natural(is) ou combinação entre um ou mais polímero(s) hidrofílico(s) natural(is) e um ou mais polímero(s) hidrofílico(s) sintético(s), como, caseína sódica, gelatina, amido de milho, amido pré-gelatinizado, estearato de magnésio, talco, dióxido de titânio, polivinilpirrolidona, polivinil álcool, polaxâmeros, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, glicolato de amido sódico (explosol), laurilsulfato de sódio, celulose, celulose microcristalina, e derivados da celulose.

29. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 28, caracterizada por conter, entre seus componentes, microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, para uso no tratamento de infecções bacterianas e processos inflamatórios, causados, preferencialmente, por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

30. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 e 21, caracterizada por ser preferencialmente formulações sólidas, como pós para bebidas lácteas contendo chocolate, mais preferencialmente, na forma de pó achocolatado.

31. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 e 21, caracterizada por ser preferencialmente formulações sólidas, como pós para bebidas lácteas contendo vitaminas e minerais, mais preferencialmente, na forma de pós para suplementos vitamínicos.

32. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 e 21, caracterizada por ser preferencialmente formulações sólidas, como pós para bebidas caféicas e, mais preferencialmente, na forma de café verde.

33. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 e 21, caracterizada por ser preferencialmente formulações sólidas, como pós para fortificar café expresso e café tradicional, mais preferencialmente, na forma de café fortificado com microcápsulas de caseinato de própolis vermelha.

34. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 e 21, caracterizada por ser preferencialmente formulações sólidas, como pós para fortificar café cappuccino, mais preferencialmente, na forma de café cappuccino fortificado com microcápsulas de caseinato de própolis vermelha.

35. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 e 21, caracterizada por ser preferencialmente formulações sólidas, como pós para fortificar sorvetes, mousses, mais preferencialmente, na forma de sorvetes exóticos fortificados com microcápsulas de caseinato de própolis vermelha.

36. Composição de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, conforme reivindicações 20 a 29, caracterizado pelo fato de microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha, em termos da tintura padronizada de própolis vermelha, com as seguintes variações: entre 70 a 110% do teor da tintura padronizada de própolis vermelha, entre 85 a 115% em termos de uniformidade de conteúdo da tintura padronizada de própolis vermelha, entre 10 e 100% da percentagem de dissolução, preferivelmente entre 70 e 110% da percentagem de dissolução para os flavonóides majoritários da tintura padronizada de própolis vermelha após 2 horas de dissolução, sendo a encapsulação por instrumentos manuais ou instrumentos semi-industriais ou industriais.

37. Uso da composição, conforme reivindicação 30, caracterizado por ser incorporada como adjuvante para fórmulas de achocolatado em pós contendo microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha.

38. Uso da composição, conforme reivindicação 31, caracterizado por ser incorporada como adjuvante para fórmulas de suplementos vitamínicos em pós contendo microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha.

39. Uso da composição, conforme reivindicação 32, caracterizado por ser incorporada como adjuvante para fórmulas de suplementos antioxidantes em pós, tipo café verde, contendo microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha.

40. Uso da composição, conforme reivindicações 33 e 36, caracterizado por ser incorporada como adjuvante para fórmulas de cafés fortificados contendo microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha.

41. Uso da composição, conforme reivindicações 33 a 37, caracterizado por ser incorporada como adjuvante para fórmulas de sorvetes exóticos e mousses contendo microcápsulas de caseinatos de própolis vermelha.

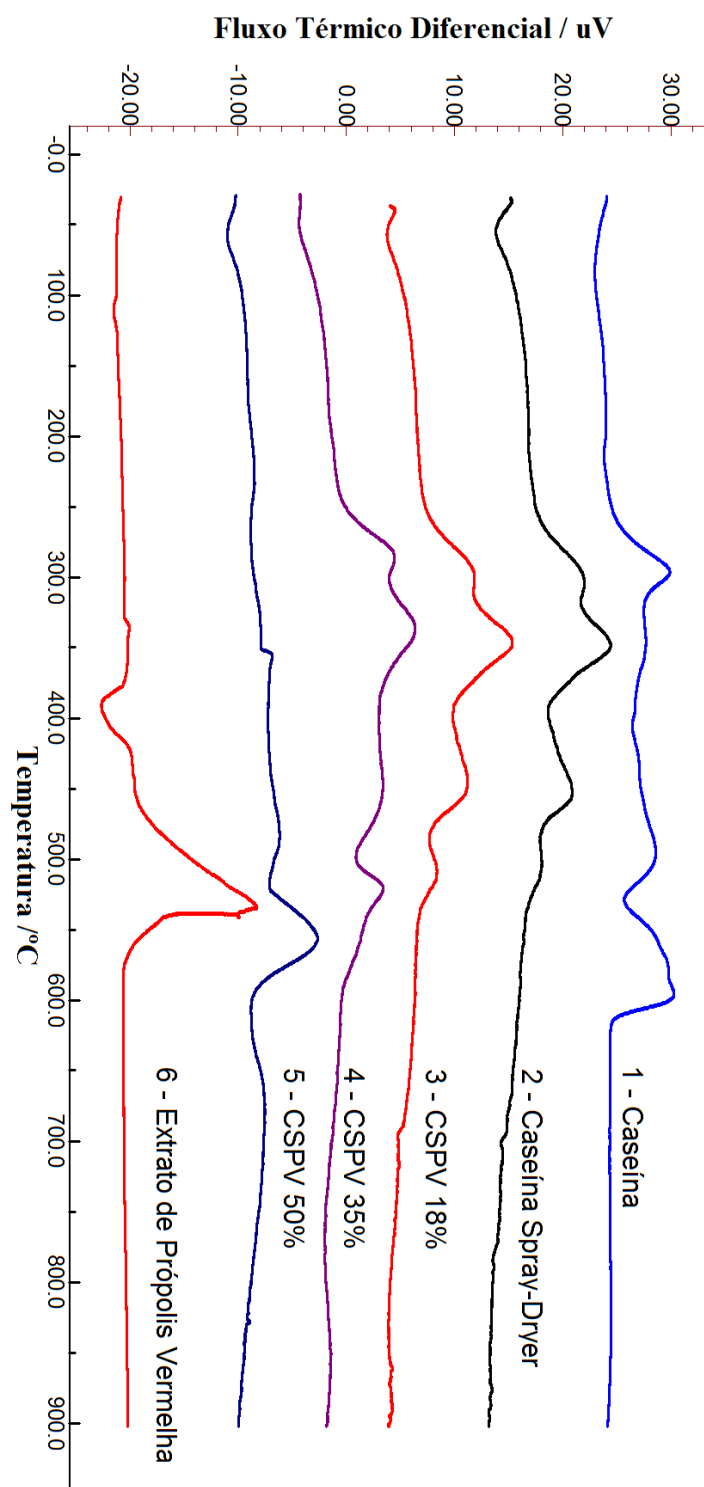
FIG. 1

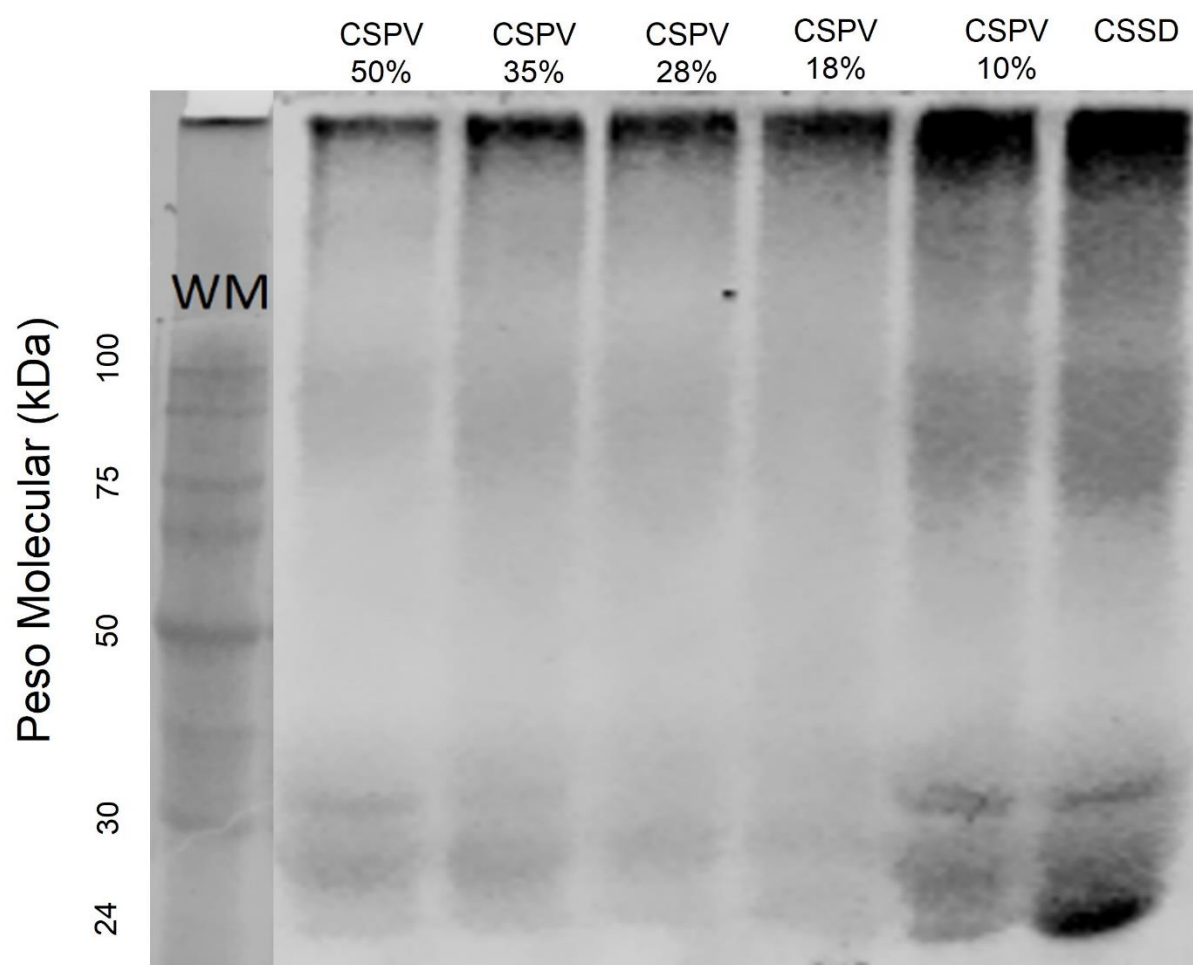
FIG. 2

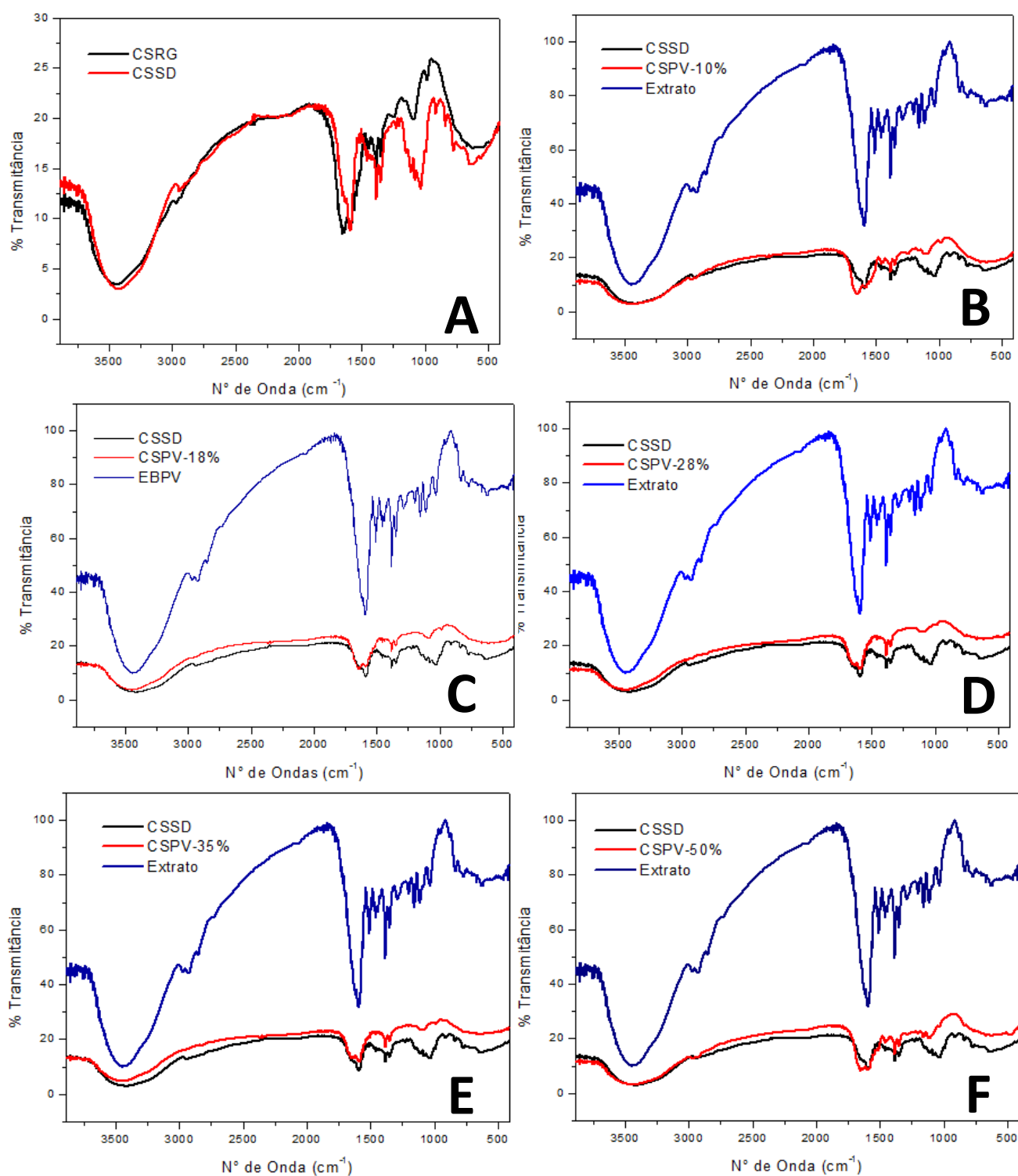
FIG. 3

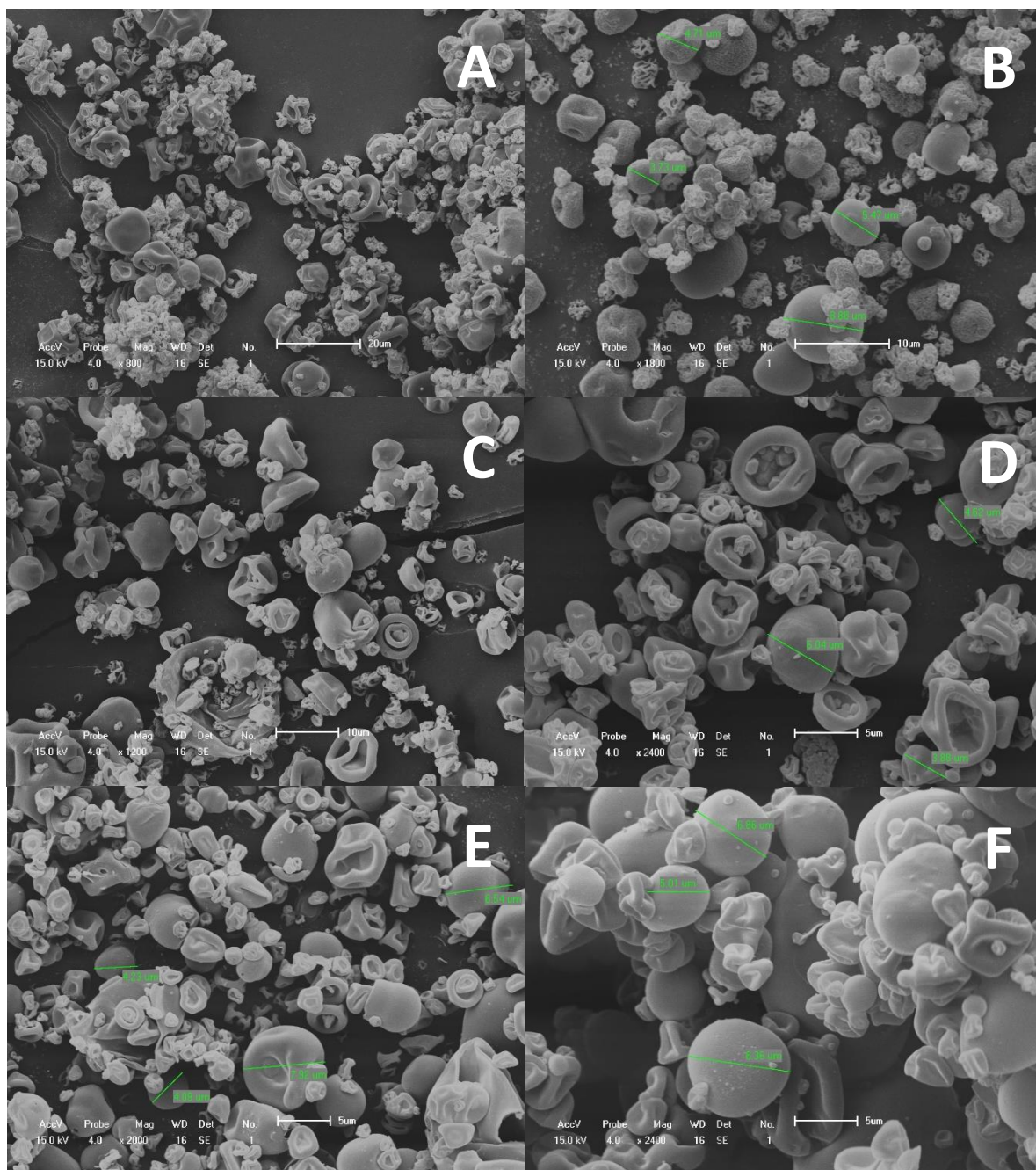
FIG. 4

FIG. 5

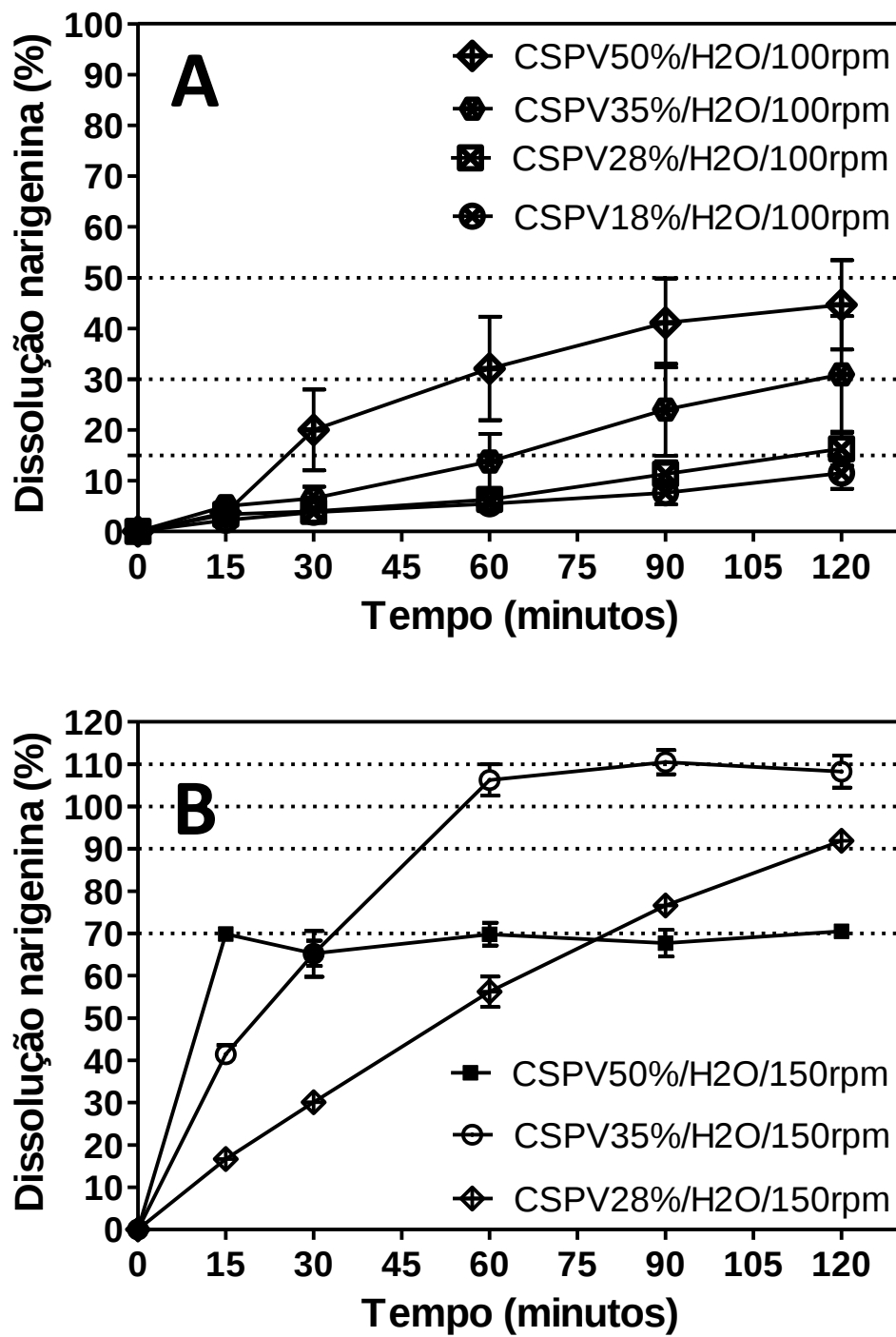
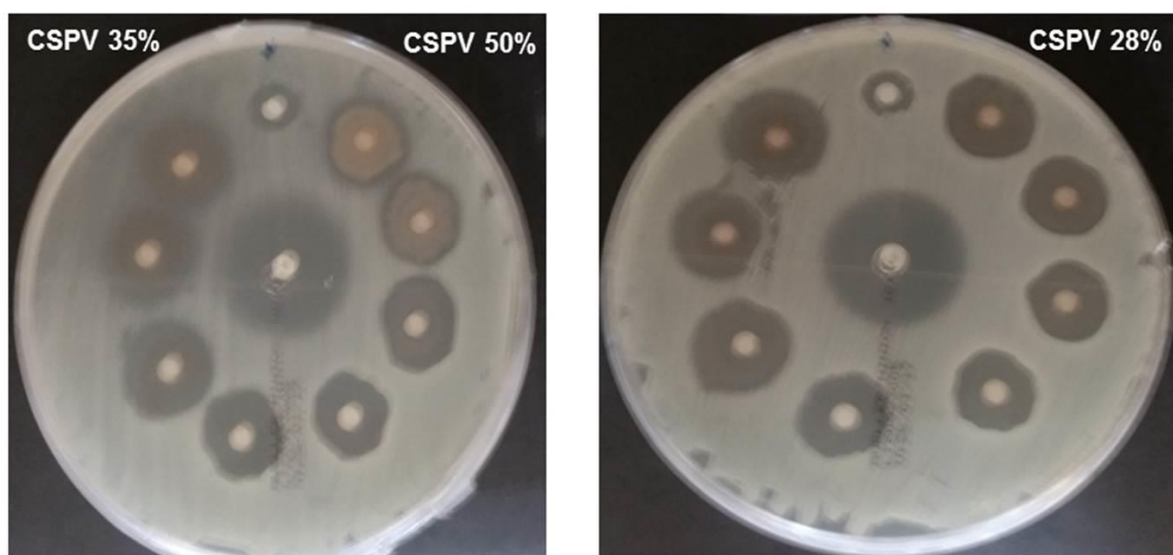


FIG. 6*Staphylococcus aureus**Pseudomonas aeruginosa*