



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102012013590-6

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 102012013590-6

(22) Data do Depósito: 24/05/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 16/12/2014

(51) Classificação Internacional: A61K 9/50; A61K 35/64; A61P 31/04; A61K 36/00.

(54) Título: MICROENCAPSULADOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MICROENCAPSULADOS, COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS CONTENDO OS MESMOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS E USOS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: Av. Lourival Melo Mota, S/N, Campus A.C., Simões, Maceió, AL, BRASIL(BR), 57072-970

(72) Inventor: TICIANO GOMES DO NASCIMENTO; IRINALDO DINIZ BASÍLIO JÚNIOR; JOÃO XAVIER ARAÚJO JÚNIOR; MÁRIO CALHEIROS DE LIMA; MOISÉS CALHEIROS DE LIMA; VALTER ALVINO DA SILVA; ZENALDO PORFIRIO DA SILVA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 24/05/2012, observadas as condições legais. Patente concedida conforme ADI 5.529/DF, que determina a alteração do prazo de concessão.

Expedida em: 24/05/2022

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues

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

Relatório Descritivo

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

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo químico-farmacêutico, mais especificamente à área de produtos naturais com utilidade à saúde pública. São propostos microencapsulados de própolis vermelha (MPV), processo de obtenção de MPV, composições farmacêuticas contendo MPV, processo de obtenção de composições farmacêuticas contendo MPV e usos. A produção de MPV está ligada à utilização de tinturas hidroalcoólicas padronizadas de própolis vermelha, seguido pela técnica de *Spray-Dryer*, apresentando-se em forma de micropartículas. Adicionalmente, o presente pedido trata de composições farmacêuticas gastrorresistentes contendo os ditos MPV. Os MPV e as composições farmacêuticas contendo os mesmos apresentam aplicação nas indústrias farmacêuticas, principalmente devido a suas atividades antimicrobianas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Própolis

Própolis é o nome genérico para um produto natural de características resinosas, balsâmicas, gomosas e altamente aderente, colhida por abelhas (*Apis mellifera*). Nas colmeias, a própolis é utilizada para fechar pequenas

frestas, embalsamar insetos mortos e protegê-las contra a invasão de insetos e microrganismos.

As abelhas coletoras, por meio de suas patas traseiras, recolhem resinas vegetais de brotos, frutos, flores e 5 exsudados, que sofrem adição de secreções de abelha. Por ser coletada de várias espécies vegetais, a própolis é um substância de composição altamente variável. Esta composição variável depende da origem geográfica, na qual está localizado o apiário e pode variar devido ao local de 10 coleta, origem botânica contendo diferentes espécies de plantas medicinais, diferentes épocas do ano e diferentes condições geográficas incluindo zonas climáticas.

Os constituintes químicos do mel e 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 20 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, 25 naringenina, crisina, pinocembrina, galangina (flavonoides); ácido gálico, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmicos e derivados (ácido fenólicos), clerodanos (diterpenóides) (**Rosalen, P.L.; Castro, M. L.; Cury, J.A.**, *Química Nova*, V. 30, N. 30 07, 1512-1517, 2007); (**Tomás-Barberán, F. A.; Martos, I.**

Cossentini, M.; Ferreres, F., J. Agric. Food Chem., V. 45, p. 28242829, 1997); (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); (Mitamura, T.; Matsuno, T.; Sakamoto, S.; Maemura, M.; Kudo, H.; Suzuki, S.; Kuwa, K.; Yoshimura, S.; Sassa, S.; Nakayama, T.; Nagasawa, H., Anticancer Research, V. 16, N. 5^a, p. 2669-2672, 1996).

Outros marcadores são específicos para a própolis verde brasileira como a isosakuranetina, bakarina, drupanina e Artepilina-C. Artepilina C vem demonstrando excelente atividade anti-tumoral (Kimoto, T.; Koya-Miyata, S., Hino, K.; Micallef, M. J.; Hanaya, T.; Arai, S.; Ikeda, M.; Kurimoto, M., Virchows Arch, V. 438, p. 259-270, 2001); (Orsolic, J.N.; Terzic, S.; Sver, L.; Basic, I., Food and Agricultural Immunology, V. 16, N. 3-4, p. 165-179, 2005); (Li H.Z., Kapur, A.; Yang, J.X.; Srivastava, S.; McLeod, D.G.; Paredes-Guzman, J.F.; Daugsch, A.; Park, Y.K.; Rhim, J.S., International Journal of Oncology, V. 31, N. 3, p. 601-606, 2007).

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., Teratogenis, Carcinogenis and Mutagenis, V. 22, p. 183-194, 2002) e imunomodulatória (**Sforcin, J. M., Kanemo, R. Funari, S. R. C., Journal of Venemous 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.

10 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**).

15 Própolis vermelha

Em se tratando da própolis vermelha, esta foi classificada como o 13º subtipo de própolis brasileira encontrada nas regiões de mangues, lagoas, rios e praias do nordeste brasileiro entre os estados da Sergipe, Alagoas, Pernambuco 20 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. A própolis vermelha também pode ser encontrada em Cuba, nas províncias de Pinar Del Rio (La 25 Coloma), Villa Clara (Manicaragua) e Matanzas (Jagüey Grande) (**Anna Lisa Piccinelli e col. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 9010-9016**); (**Osmany Cuesta-Rubio e col. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 7502-7509**).

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
5 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
10 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,
15 dalbergina (neoflavonóides) (**Park e col. eCAM (2008) 5 (4) 435-441**).

Pesquisadores estudando a própolis vermelha da região dos
manguezais de Marechal Deodoro-Alagoas, identificaram o
flavonóide crisina e quercetina, novos isoflavonóides na
20 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
25 (**Alencar e col. eCAM (2008) 5 (3) 313-316**).

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) (**Vassyva Bankova e col. eCAM (2006) 3 (2) 249–254**).

Com vistas à descoberta de moléculas e seus alvos terapêuticos para cura das doenças, a própolis vermelha tem 5 sido submetida a diversos estudos detalhados sobre suas atividades biológicas.

A presença de vários flavonoides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas de própolis mostram que estas substâncias agem sinergisticamente em ação 10 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.

15 Microencapsulamento

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 20 opoterápico 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 25 estabilidade, validação de metodologias analíticas, embalagens e controle de qualidade de produto.

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

5 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.

10 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

15 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 20 consequentemente a ação farmacológica, bem como a aceitabilidade pelo consumidor.

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 25 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 30 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 5 número de excipientes deve ser reduzido para o mínimo possível e deve conter somente excipientes essenciais (Croelley, 1999; Robertson, 1999).

Alguns excipientes farmacêuticos podem gerar influências negativas para a composição farmacêutica ou nutracêutica. 10 Os diluentes são em geral os excipientes que se utilizam em maior proporção numa composição e a sua escolha deve ser bem definida para evitar problemas de incompatibilidade fármaco-excipiente ou excipiente-excipiente, reduzir a estabilidade da(s) substância(s) ativa(s), na composição, 15 bem como problemas de toxicidade. Exemplos clássicos são os diluentes manitol e sorbitol que pode reduzir absorção de fármaco, reduzir o peristaltismo intestinal, provocar problemas de hiperosmolaridade e hipersensibilidade (D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, J.R. Wilding, 20 Br. J. Clin. Pharmacol. 39 (1995) 381-387), (D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, J.R. Wilding, J. Pharm. Sci. (1995) 84 1405-1409), (E. Jantratid, S. Prakongpan, J.B.. Dressman, G.I. Amidon, H. E. Junginger, K. K Midha, D. M. Barends; Journal of Pharmaceutical 25 Sciences, (2006) 95 974-984).

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, 30 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 5 ou no enchimento de cápsulas gelationosas.

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 10 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.

No processo de microencapsulação os excipientes 15 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 20 nanopartículas.

Uma formulação de nanopartículas polimérica de própolis (própolis nanoalimentos) foi desenvolvida utilizando agregados micelares de copolímeros reticulados e aleatória de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) com N-vinil-2-pirrolidona 25 (VP) e poli (etilenoglicol) monoacrilato (PEG-A) (**Kim, Dong-Myung, Lee, Gee-Dong, Aum, Seung-Hyun, Kim, Ho-Jun, Biological & Pharmaceutical Bulletin, (2008) 31, 1704-1710**). É importante destacar que, o uso do sistema matricial proposto por Kim e colaboradores, para formação

de os microencapsulados de própolis, apresenta como grande desvantagem o alto custo para aquisição dos excipientes. Em contraposição, a invenção proposta no presente documento, utiliza excipientes de baixo custo, tornando os

5 microencapsulados e as composições farmacêuticas que os utilizam produtos mais acessíveis economicamente.

A patente chinesa **CN101869234** demonstra a preparação de nanoemulsões de própolis contendo acetato de etila e tween.

10 A preparação de microencapsulados utilizando o sistema matricial da patente CN101869234 apresenta como grande desvantagem a alta toxicidade do acetato de etila, para consumo humano. Se ingerido, o acetato de etila apresenta potencial risco de intoxicação como perdas do sentido, náuseas, vômitos, diarreia, tontura e sonolência.

15 O documento **KR20100078349** revela preparações de nanoemulsões de própolis utilizando excipiente β -ciclodextrina. É importante destacar que, o uso do sistema matricial com a β -ciclodextrina para formação dos microencapsulados de própolis torna o produto de alto custo, o que é desvantajoso em termos de mercado. Esta desvantagem é 20 potencializada, quando comparamos a utilização de excipientes como amido, gelatina e aerosil, conforme proposto no presente documento.

A patente **KR20090075395** reivindica nanopartículas de própolis para uso parenteral contendo os excipientes N-isopropilacrilamida, N-vinil-2-pirrolidinona (VP) e poli(etenoglicol) acrilato (PEG-A). É importante destacar que, o uso dos excipientes propostos pela patente coerana em questão para formação de os microencapsulados de

própolis, apresenta como grande desvantagem o alto custo para aquisição destes produtos.

Adicionalmente, o documento **KR20080089723** revela a preparação de pó de própolis contendo gelatina para preparar creme dental e fio dental. O uso da própolis para fins odontológicos é amplamente descrito no estado da técnica. O sistema matricial proposto pelo documento em questão apresenta-se diferenciado do proposto pela presente invenção, que trata do sistema matricial de microencapsulados para uso em cápsulas/comprimidos gastrorresistentes.

Microencapsulados de própolis contendo um amido modificado (Octenil-succinato de amido) e goma arábica foram obtidos pela técnica de *Spray-Dryer* (**Silva F. C., Thomazini M.1, Alencar S. M. and Favaro-Trindade C. S., XVIIth International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherlands ; September 24-26, 2009**). O uso deste sistema matricial para formar os microencapsulados de própolis apresenta como grande desvantagem o alto custo para aquisição do octenil-cuccinato de amido, em relação ao amido pré-gelatinizado, proposto no presente documento.

Pesquisas de Nayan Roy (**Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 76 (2010) 317-325**) tem incorporado extratos de própolis indiana a uma matriz contendo ouro e prata. Tais produtos apresentam alto valor agregado, encarecendo o valor dos produtos derivados deste tipo de microencapsulado.

Processo de obtenção de componentes da própolis no estado seco utilizando gelatina contendo solução de própolis da

cidade de Maringá (Paraná) foram preparadas por secagem por spray-dryer. A otimização das condições de secagem por pulverização e as proporções de gelatina e manitol foram investigados (**M.L. Bruschi, M.L.C. Cardoso, M.B. Lucchesi**,

5 **M.P.D. Gremião, International Journal of Pharmaceutics (2003) 264, 45-55**). É fundamental se destacar que, a utilização de diferentes tipos de excipientes permite diferentes mecanismos de liberação das substâncias ativas da matriz farmacêutica (microencapsulados), além de 10 diferentes ações fisiológicas. Alguns excipientes farmacêuticos podem gerar influências negativas para a composição farmacêutica ou nutracêutica. Exemplos clássicos são os diluentes manitol e sorbitol que podem reduzir absorção de fármaco, reduzir o peristaltismo intestinal, 15 provocar problemas de hiperosmolaridade e hipersensibilidade. Desta forma, evidencia-se que, os microencapsulados propostos no presente documento de patente apresentam vantagens destacada frente ao estado da técnica, pela utilização de excipientes adequados para a 20 liberação dos elementos ativos constantes na própolis.

O pedido de patente brasileiro **PI05001757** utiliza apenas dois excipientes (gelatina e manitol) e demonstra apenas processo de preparação de uma matriz intermediária contendo extratos de própolis não divulgando a procedência da 25 própolis utilizada. É importante se destacar que, o MPV reivindicado no presente documento apresenta características inovadoras em relação aos microencapsulados da PI0500175-7, apresentando uma maior percentagem do extrato de própolis na composição (25 a 55%) em relação 30 àquele documento, que apresenta apenas 10 a 12%. Dessa forma, reduz-se custo de produção dos microencapsulados com

menor quantidade de excipientes na composição, bem como desenvolvimento de composições contendo faixa ampla de concentração da tintura padronizada de própolis vermelha. Adicionalmente, o processo de obtenção dos MPV proposto no 5 presente documento de patente pode ser preparado a frio pelo método de dispersão sol-gel, contendo um sistema ternário com três excipientes (gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil), apresentando propriedades dispersantes e também antiaderente. O Processo de 10 preparação por emulsificação foi realizado a temperatura controlada de 37 °C, para evitar problemas de modificações polimórficas estruturais da gelatina com perdas da funcionalidade de emulsificante.

Nenhum dos documentos de patente descritos revela um método 15 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 20 microencapsulado citado no estado da técnica apresentam como substância bioativa a própolis vermelha dos manguezais de Alagoas.

Desta forma, as modalidades da invenção descritas neste documento apresentam vantagens consideráveis frente ao 25 estado da técnica.

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 farmacêuticas para o tratamento e prevenção de 30 doenças. Desta forma, propõem-se microencapsulados de

própolis vermelha, composições com a utilização de MPV, processos para obtenção de MPV e usos destes produtos para preparo de medicamentos com ação citostática/citotóxica, anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana e

5 antioxidante.

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

10 primordial na atividade dos microencapsulados e demais composições farmacêuticas, para prevenção e tratamento de doenças.

A principal vantagem dos microencapsulados e composição farmacêutica propostos na presente invenção, frente ao

15 estado da técnica, está na utilização de 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 gastrorresistente e uma

20 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.

25 A patente de invenção da China (CN102429141 - Method for preparing propolis microcapsules and application) trata-se um método (processo) de preparação de microcápsulas de própolis e suas aplicações (usos). Neste documento, observou-se na descrição detalhada da invenção e nas

reinvindicações o uso de Freeze drying (liofilização) na preparação das microcápsulas, bem como o uso do adjuvante Zeína (proteína do Milho) que foi combinada com gelatina e pectina.

5 Na preparação Da patente aqui pretendida, não foi utilizado zeína, nem tão pouco a mistura de gelatina com pectina na preparação. Além disso, no processo de secagem não foi usado a técnica de Freeze drying (liofilização). O ingrediente ativo da composição foi o extrato de própolis
10 vermelha de Alagoas que apresenta IG no INPI. Foi utilizado os excipientes (Gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil). Então o sistema matricial para preparação das microcápsulas foi diferente. O amido pré-gelatinizado apresenta em sua composição carboidratos e não a zeína
15 (proteína do milho). A técnica de secagem utilizada foi o Spray-Dryer, portanto, uma técnica de secagem diferente da técnica Freeze Drying (liofilização). Desta forma nenhuma modificação no quadro reinvindicatório será realizada devido ao documento de patente CN102429141 - Method for
20 preparing propolis microcapsules and application. Qualquer modificação nos componentes de um processo e no processo de secagem torna o processo e a composição diferente. Portanto, entendemos que os componentes usados para
25 formação das microcápsulas CN102429141 são considerados diferentes em relação a patente aqui pretendida.

O artigo científico BRUSCHI ML ET AL. 2003 Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization, trata de uma preparação e caracterização de microcápsulas de gelatina
30 contendo própolis e relata sua preparação e caracterização.

Neste artigo científico, os autores declaram a origem ou procedência da própolis que foi obtida numa unidade experimental da Universidade Estadual do Maringá (Estado do Paraná-BRASIL). Os excipientes usados para a preparação das 5 microcápsulas foram a gelatina e o manitol e a técnica de secagem foi o SPRA-DRYER. Então, podemos afirmar que a própolis usada não foi a própolis Vermelha de Alagoas. Os componentes utilizados para preparação das microcápsulas (gelatina, ou gelatina e manitol) são diferentes na 10 preparação da patente aqui pretendida, citando (gelatina, amido e aerosil). Qualquer modificação nos componentes de um processo torna a composição diferente. O processo de preparação das microcápsulas para secagem em spray-dryer usou o processo de preparação por gotejamento, enquanto a 15 técnica de preparação citada no nosso documento de patente BR102012013590-6, foi a técnica de preparação SOL-GEL. O processo de secagem por SPRAY-DRYING usou equipamento SPRAY-DRYER da BUCHI® Modelo MINI SPRAY-DRYER B-191. Na patente aqui pretendida usou-se equipamento nacional, 20 Labmaq modelo LM MSD 1.0, equipamento diferente. A palavra técnica de secagem por spray-dryer será removida da reivindicação, pois a busca da anterioridade mostrou que o Documento científico BRUSCHI ML ET AL. 2003 Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying 25 technique: preparation and characterization já apresenta a técnica de Spray-dryer para secagem de microcápsulas de própolis. Apenasr da patente aqui pretendida ser o primeiro a citar técnica de spray-dryer para secagem de microcápsulas de extrato de própolis vermelha de Alagoas, 30 própolis esta que recebeu a primeira IG de bioproduto da biodiversidade Alagoana. Portanto estas microcápsulas são

consideradas novidade (inéditas) na literatura científica e patentária.

Diante destas arguições, considera-se que o processo de secagem se assemelha nesta etapa do processo (secagem por spray-dryer), apesar de que na etapa de secagem por spray-dryer para microcápsulas de própolis vermelha é considerado novidade (inédita).

O artigo científico ALENCAR ET AL. 2007 "Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis", trata de caracterização química e microbiológica do extrato e frações (clorofórmica e Hexânica) da própolis vermelha de Alagoas. Neste estudo Alencar et al. 2007 identifica os flavonoides e isoflavonóides presentes no extrato e frações de própolis vermelha, bem como demonstra a atividade antibacteriana da própolis vermelha contra cepas ATCC de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* UA159. O artigo científico de Alencar et al. 2007 não realiza nenhuma preparação de microcápsulas de própolis vermelha de Alagoas.

A patente aqui pretendida realiza preparação de microcápsulas de própolis vermelha, bem como demonstra a atividade antimicrobiana das mesmas microcápsulas de própolis vermelha por meio do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) usando duas bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 consideradas Gram positiva (+) e Gram negativa (-), respectivamente.

Apesar de que o artigo científico de ALENCAR ET AL. 2007 "Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis" foi o primeiro a citar 5 técnica de atividade antibacteriana para caracterizar biologicamente o extrato e frações (clorofórmica e hexânica) de própolis vermelha de Alagoas, não realizou o ensaio para os microencapsulados de própolis vermelha de Alagoas. Vale lembrar que os microencapsulados de própolis vermelha apresentam na composição o extrato hidroalcólico e 10 agentes emulsificantes SOL-GEL, portanto uma nova composição modificada para o extrato de própolis vermelha adicionada de agentes emulsificantes SOL-GEL que pode ser considerada inédita (novidade no estado da técnica), em 15 relação aos extratos naturais de própolis vermelha (sem modificação tecnológica) testados por ALENCAR et AL. 2007.

Diante destas arguições, considera-se que o processo 20 caracterização antibacteriano usando a técnica MIC não se assemelha nesta etapa do processo (ensaio antimicrobiano) ao ensaio de ALENCAR ET AL. 2007 que utiliza *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* UA159. Na etapa de caracterização da atividade antimicrobiana da microcápsulas de própolis vermelha ter sido realizada com a nova composição usando agentes emulsificantes SOL-GEL, portanto, considera-se a composição novidade (inédita). 25 Além disso, o artigo científico de ALENCAR ET AL. 2007 "Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis" não realiza ensaios com a cepa Gram negativa (-) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e nem tão pouco com as microcápsulas de própolis 30 vermelha de Alagoas, o que também torna o documento de patente sob julgamento inédito (novidade) e ativo (vivo).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção apresenta microencapsulados de própolis vermelha, compostos por tintura de própolis vermelha, diluente, promotor de fluidez e dispersante ou emulsificante. A invenção trata também do processo de obtenção do microencapsulado, por meio da técnica de *Spray-Dryer*. Adicionalmente, apresenta-se modalidade de invenção em termos de composição contendo os microencapsulados em formulações sólidas, preferencialmente, na forma de cápsulas gelatinosas gastrorresistentes. 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 retardar a liberação das substância(s) ativa(s) contidas no núcleo e que é dependente do pH; iii) uma camada externa responsável pelos processos lubrificação, diluição, fluidez, molhabilidade e desagregação/dissolução da camada intermediária e núcleo interno. Ainda, a invenção trata do processo de preparação da composição, pela realização de misturas físicas com os microencapsulados de própolis vermelha para garantir teor e uniformidade de conteúdo e encapsulamento. Por fim, são apresentados usos para os microencapsulados e para a composição em questão.

25 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS/DESENHOS

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:

A **Figura 1** anexa apresenta um fluxograma simplificado das principais etapas do processo de obtenção de MPV.

A **Figura 2** anexa apresenta um fluxograma simplificado das principais etapas do processo de obtenção de composições 5 farmacêuticas contendo MPV.

A **Figura 3** anexa apresenta a Fotomicroscopia de Varredura Eletrônica dos Microencapsulados A, B, C e D da própolis vermelha de Alagoas. Fotomicrografias A1, B1, C1 e D1 ampliação de 500 vezes (escala 50 μ m); A2, B2, C2 e D2 10 ampliação de 1000 vezes (escala 10 μ m) e A3, B3, C3 e D3 ampliação de 2000 vezes (escala 10 μ m).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os produtos, processos e usos descritos na presente invenção podem ser melhor detalhados e compreendidos 15 mediante referência às figuras presentes neste documento e a seguinte descrição:

Microencapsulados de própolis vermelha (MPV)

Os microencapsulados apresentados no presente documento distinguem-se dos já descritos no estado da técnica pelo 20 fato de que as concentrações de flavonoides, isoflavonóides, chalconas e ácidos fenólicos serem diferenciadas devido à especificidade da própolis vermelha.

Os MPV, além da tintura com os princípios ativos de interesse, obtidos da própolis vermelha, apresentam em sua 25 formulação os excipientes farmacêuticos usuais com diferentes funcionalidades sendo eles: composto ativo

(tintura), diluentes, promotor de fluidez/antiaderência, dispersante/emulsificante.

Em uma modalidade da presente invenção, um microencapsulado MPV A, apresenta-se uma composição de: tintura

5 hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 20 e 60%; diluente em proporção entre 5 e 95%; dispersante em proporção entre 5 e 95%; e promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 5%.

10 Outra modalidade da invenção proposta, um microencapsulado MPV D, apresenta-se a seguinte composição: tintura hidroalcoólica padronizada proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 20 e 60%; diluente em proporção entre 5 e 50%; emulsificante em 15 proporção entre 5 e 60%, preferivelmente entre 20 e 45%; e um promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 5%.

Em ambas as modalidades da invenção, tanto em MPV A quanto em MPV D, o sistema dispersante é caracterizado por ser um sistema ternário, composto por gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil.

20 Os microencapsulados de própolis vermelha (MPV A e MPV D), por consistir de excipientes aerosil na composição, apresentam propriedades antiaderentes que reduzem o contato da matriz intermediária de revestimento com as paredes do recipiente de preparação evitando formação de agregados dos 25 excipientes gelatina e amido e consequentemente evitando variações de uniformidade de conteúdo dos MPV obtidos.

Ainda, é importante destacar que, os microencapsulados propostos no presente documento apresentam-se inovadores por apresentarem uma maior percentagem do extrato de própolis na composição (25 a 55%), em relação ao estado da técnica, que apresenta concentrações menores. Dessa forma, reduz-se custo de produção com menor quantidade de excipientes na composição, bem como desenvolver composições contendo ampla faixa de concentração da tintura padronizada de própolis vermelha. **Processo de obtenção de MPV**

As etapas de obtenção de MPV incluem a preparação do extrato bruto a partir da própolis vermelha, preparação da tintura hidroalcoólica padronizada a partir do extrato bruto da própolis vermelha, preparação dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha, e secagem dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha, formando os MPV (**Figura 1**).

- Preparação do Extrato Bruto de Própolis Vermelha

Uma amostra de 100 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 80 °GL, por período de 12 a 48 horas. O processo de extração é repetido até completa extração das substâncias ativas. Alternativamente, método de extração por percolação pode ser utilizado em substituição à maceração. Opcionalmente para acelerar a extração, o material pode ser colocado em banho ultrassônico para completa extração das substâncias ativas em período entre 30 minutos a 3 horas, ou ainda, pode ser submetido a processo de extração por refluxo em aparelho de soxhlet por período entre 2 a 10 horas.

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. Alternativamente, pode ser concentrado usando banho-maria a 37°C a 42°C.

Uma massa sólida escura será obtida com percentagem de solvente entre 5 a 35%, sendo denominado extrato bruto de própolis vermelha. O extrato bruto, preferivelmente, deverá apresentar percentagem de solvente entre 5 a 12%.

- Obtenção da tintura hidroalcoólica padronizada

O extrato bioativo de própolis vermelha, obtido na etapa anterior, é submetido a processo de lavagem com etanol absoluto, seguido de evaporação deste solvente por 3 vezes com o intuito de eliminar a presença do solvente tóxico na formulação.

O extrato bruto de própolis vermelha (50 a 75g) com a mínima percentagem de solvente (5 a 12%) 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), preferivelmente entre (70:30, v/v) ou (80:20, 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.

Opcionalmente, tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha em concentração preferencialmente entre 20% e 30% (p/v) pode ser submetida a processo de particionamento com hexano, seguido pela adição de 5 clorofórmio para remoção de alguns interferentes, dentre eles ceras e material graxo e este procedimento dependerá das qualidade inicial da própolis vermelha obtida *in natura*. O extrato clorofórmico obtido neste processo de particionamento (50g a 60g) é concentrado em rotaevaporador 10 e utilizado para obtenção de extrato clorofórmico enriquecido de própolis vermelha, que também pode ser denominado de extrato bioativo de própolis vermelha.

O extrato bioativo de própolis vermelha, obtido na etapa anterior, é submetido a processo de lavagem com etanol 15 absoluto por 3 vezes, seguido de evaporação deste solvente com o intuito de eliminar a presença do solvente tóxico na tintura hidroalcoólica de própolis vermelha. Tinturas hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha são, em seguida, preparadas em concentração preferencialmente entre 20 15% a 25% (p/v) para obtenção dos MPV.

- Preparação dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha

Para preparação dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha são utilizados os 25 excipientes farmacêuticos usuais com diferentes funcionalidades sendo eles: composto ativo (tintura hidroalcoólica padronizada), diluentes, promotor de fluidez/antiaderência, dispersante / emulsificante.

Para preparação dos sistemas sol-gel e 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.

5 Esta tintura é reservada para posterior incorporação ao sistema disperso sol-gel e para o sistema emulsivo.

Os adjuvantes da preparação do sistema sol-gel A contendo tintura de própolis vermelha são adicionados em um recipiente contendo 450 mL de água destilada de uma única 10 vez (*one pot mixture*). Em seguida, a tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha (150 mL) é incorporada ao sistema disperso sol-gel com 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, 15 v/v) ou (80:20, v/v), preferivelmente entre 20 a 45 °GL e mais preferivelmente de 35 °GL contendo os adjuvantes em temperatura ambiente entre 25 e 30 °C.

O sistema dispersante é composto por sistema ternário (gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil) que se mantém 20 como sistema disperso instável que decantava na ausência de agitação. O sistema permanece sob agitação constante para manter-se num estado gel, pois quando se interrompe o processo de agitação ou mantém-se em repouso, o sistema se convertia para uma dispersão sol. Esta propriedade foi 25 obtida graças às propriedades tixotrópicas do dispersante (aerosil). Além disso, o aerosil promoveu melhor dispersão da tintura hidroalcoólica padronizada durante preparação dos microencapsulados. Outra vantagem destas composições contendo aerosil (MPV A e MPV D) é a sua propriedade 30 antiaderente evitando perdas de excipientes que se

depositava nas paredes do recipiente de preparação durante agitação.

Os adjuvantes da preparação do MPV D são preparados em outro recipiente com uma quantidade de 550 mL de etanol: 5 água (30:70, v/v) ou (20:80, v/v) ou (10:90, v/v) ou (02:98, v/v), preferivelmente entre (02:98, v/v) a (10:90, v/v) com uma auxílio de uma agitador. A gelatina é adicionada e solubilizada, seguido pela adição do amido pré-gelatinizado e por fim foi adicionado o aerosil. Em 10 seguida, a tintura hidroalcoólica padronizada (150 mL) é incorporada lentamente ao sistema emulsificante contendo sistema de solvente etanol:água (10:90, v/v) ou (15:85, v/v) ou (20:80, v/v) ou (30:70, v/v) ou (40:60, v/v) ou (50:50, v/v) e preferivelmente entre 10 e 40 °GL contendo 15 adjuvantes e mais preferivelmente 15 °GL sob temperatura preferencial entre 30 °C e 45 °C e mais preferivelmente a 37 °C. O sistema emulsificante é composto por sistema ternário (gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil) que se mantém como uma emulsão estável sob agitação ou em 20 repouso.

- Secagem dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha usando *Spray-Dryer*

Os sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha, são então submetidos a processo de 25 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 120 a 180°C, temperatura de saída 90 a 130°C, fluxo de bombeamento 0,3 L/h e vazão de ar de 4,50 Litros. Desta

forma, são obtidos pós dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha e estes pós são microencapsulados de própolis vermelha. O sistema sol-gel contendo a tintura da própolis vermelha, após o *Spray-Dryer*, gera o MPV A e o sistema emulsificante contendo tintura de própolis vermelha, após o *Spray-Dryer*, gera o MPV D.

É importante destacar que, o processo aqui proposto para a preparação dos microencapsulados pode ser realizado a temperatura ambiente pelo método de dispersão sol-gel. Ainda, o processo de preparação por emulsificação foi preparado a temperatura controlada de 37 °C, para evitar problemas de modificações polimórficas estruturais da gelatina com perdas da funcionalidade de emulsificante.

15 Composições farmacêuticas contendo MPV

Os MPV obtidos podem ser utilizados em diversas composições farmacêuticas, preferencialmente como formulações sólidas, como pós, comprimidos, cápsulas gelatinosas, dentre outras.

As composições farmacêuticas propostas no presente documento consistem em composições, preferencialmente na forma de cápsulas duras ou comprimidos, 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 retardar a liberação das substância(s) ativa(s) contidas no núcleo e que é dependente do pH; iii) uma camada externa responsável pelos processos lubrificação, diluição, fluidez, molhabilidade e desagregação/dissolução da camada intermediária e núcleo interno.

É importante destacar que, nas composições farmacêuticas aqui propostas os MPV constituem o núcleo (i), com os elementos ativos da tintura de própolis vermelha, e a camada intermediária (ii), composta dos sistemas ternários 5 constituintes dos MPV.

Em se tratando do núcleo dessas composições farmacêuticas, o mesmo é formado por substâncias ativas da tintura padronizada da própolis vermelha, que estão presentes nos MPV.

10 A camada intermediária de revestimento do núcleo consiste de um polímero hidrofílico natural ou combinação de mais de um polímero(s) hidrofílico(s) natura(is). Em uma modalidade distinta da invenção, a camada intermediária pode ser preparada também pela conjugação entre um ou mais 15 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 20 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 25 do núcleo deve apresentar percentagens entre 5% e 95%, e preferencialmente entre 30 e 75% em relação ao peso total da composição.

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 pela mudança de pH após passagem do material particulado pelo piloro. O 5 mecanismo de liberação gastrorresistente acontece quando a composição contendo polímeros naturais ou sintéticos com função de ácido fracos ou esterificadas insolúveis em meio gástrico (estômago) com um pH < 4.0, deixam o estômago e entram no duodeno através do piloro atingem pH > 6.0 se 10 dissolvem à medida que se desloca ao longo do intestino delgado onde o pH aumenta para 7 a 8

Em termos de porcentagens dos excipientes farmacêuticos na camada externa, estes podem representar entre 0,05% e 100% do peso total da camada externa, de acordo com a sua 15 funcionalidade na matriz farmacêutica. Em termos de proporção da camada externa na composição farmacêutica final, a camada externa da composição deve apresentar percentagens entre 0,01% e 50%, preferencialmente entre 1 e 15% em relação ao peso total da composição.

20 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 25 escura.

Ainda, os excipientes farmacêuticos 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, goma guar, goma arábica, estearato de magnésio, talco, dióxido de titânio, 5 polivinilpirrolidone, carbômeros, 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 10 hydroxipropiletilcelulose.

Processo de obtenção de composições farmacêuticas contendo MPV

As etapas de obtenção de composições farmacêuticas contendo MPV podem ser identificadas pelos seguintes passos 15 principais: obtenção de microencapsulados 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 (**Figura 2**).

Os MPV obtidos podem ser utilizados em diversas composições 20 farmacêuticas, preferencialmente como formulações sólidas, como pós, comprimidos, cápsulas gelatinosas, dentre outras.

Preferencialmente, para a preparação de cápsulas gelatinosas duras contendo MPV, os microencapsulados são submetidos a processo de mistura pelo método de diluição 25 geométrica com os excipientes do tipo desintegrantes ou superdesintegrantes em proporção entre 0,5 e 15% (preferivelmente entre 1 a 10%, e mais preferivelmente entre 2 a 7%) num tempo compreendido entre 5 e 120 minutos, mais preferivelmente entre 25 e 65 minutos. Em seguida, os

microencapsulados são misturados com excipientes do tipo agentes molhantes em proporção entre 0,5 e 10%, preferivelmente entre 1 e 5% e mais preferivelmente entre 2 e 3,5%, num período de 5 a 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 0,75 e 2%, em um período de 2 a 10 minutos, mais preferivelmente entre 3 e 7 minutos.

A encapsulação pode ser realizada em instrumentos manuais (tablado para encapsulação), instrumentos semi-industriais e industriais, ajustando a massa do MPV 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.

Usos de MPV e de composições farmacêuticas contendo os mesmos

Diante de tais atividades biológicas dos microencapsulados da própolis vermelha, estes podem ser utilizados em uma ampla gama de setores industriais, como cosmética, farmacêutica e alimentícia.

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.

A própolis vermelha apresenta atividades biológicas antibacterianas para as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, com 5 inibição do crescimento bacteriano, quando submetido tanto à tintura da própolis vermelha, quanto aos microencapsulados da própolis vermelha.

Devido à sua característica biológica comprovadamente 10 antibacteriana, os microencapsulados e composições farmacêuticas contendo microencapsulados obtidos pelos processos propostos podem ser utilizados para: tratamento de infecções bacterianas de amplo espectro de ação; tratamento de processos inflamatórios de origem bacteriana; 15 tratamento de feridas de decúbitos em pacientes com pé diabético; tratamento de processos inflamatórios e infecciosos em geral.

Os usos aqui descritos apresentam-se como novidade ao 20 estado da técnica, em termos de atividades e atuações da própolis vermelha.

Assim, as modalidades da invenção descritas no presente documento apresentam-se como um avanço no estado da técnica já que, permitem a produção de MPV e composições farmacêuticas contendo os mesmos de maneira economicamente 25 viável. Desta forma, os MPV 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

As avaliações dos MPV obtidos utilizando o processo proposto demonstraram a obtenção de um produto adequado, puro e de atividade preservada. Os resultados obtidos estão 5 representados nas tabelas e figuras indicadas.

EXEMPLO 1 – Ensaios de microscopia eletrônica de varredura dos microencapsulados (MPV A, MPV B, MPV C e MPV D)

O ensaio de microscopia eletrônica de varredura foi utilizado para comprovar que as partículas obtidas por 10 *Spray-Dryer* apresentam-se na forma de micropartículas, também chamadas de microesferas ou também chamados de microencapsulados. Os resultados mostram que as partículas apresentam tamanho entre 50 μm e 10 μm .

A morfologia dos microencapsulados *Spray-Dryer* de própolis 15 vermelha (MPV) foram avaliados com um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os pós foram fixados a uma fita adesiva dupla-face, revestido com ouro 40 mA, sob vácuo e analisados com um microscópio eletrônico de varredura, modelo JEOL JSM-6460 (Tóquio, Japão). MEV foi 20 operado a 15 kV com aumentos de 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000 vezes (**Figura 3**).

As fotomicrografias dos MPV B que continha apenas um único adjuvante revelaram micropartículas grandes, $> 50\mu\text{m}$ (**Figura 3B2**), uma superfície irregular e não uniforme para MPV B. O 25 MPV C apresentou uma superfície esférica, lisa, aglomeradas, não uniformes com aspecto quebradiço e micropartículas com tamanho entre 50 μm e 10 μm (**Figura 3C1 e 3C2**).

As fotomicrografias dos micropartículas dos MPV A e D apresentaram pequenas partículas com superfície esférica e muito lisa, não aglomeradas, uniformes. As fotomicrografias revelaram partículas esféricas com tamanho de partículas 5 entre 50 e 10 μ m. Os microencapsulados podem ser classificados como microesferas de própolis vermelha, independentemente do método de preparação (dispersão ou emulsificação), nestas proporções e tipo de adjuvantes utilizados na composição dos MPV.

10 EXEMPLO 2 - Ensaio antimicrobiano CIM da tintura e microencapsulados da própolis vermelha

Para as análises foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: BAC 1 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; BAC 2 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, pelo método de 15 difusão em Agar.

Foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a tintura padronizada de própolis vermelha (**Tabela 1**) e para os MPV A e D após processo de secagem por spray-dryer com o intuito de averiguar se houve 20 perda da atividade biológica após o processamento (**Tabela 2 e 3**).

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima da tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha usando método de difusão em ágar.

<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	
Concentração (μg)	Diâmetro do halo de inibição (mm); zona de inibição em (mm)	Concentração (μg)	Diâmetro do halo de inibição

			(mm); zona de inibição em (mm)
2500	22 ; 7	2000	28 ; 10
2000	22 ; 6	1200	28 ; 10
1500	20 ; 6	800	28 ; 10
1000	19 ; 6	640	26 ; 9
800	21 ; 6	480	24 ; 8
600	20 ; 5	400	24 ; 8
400	19 ; 5	320	24 ; 8
300	18 ; 4	240	24 ; 8
200	17 ; 3	200	24 ; 8
100	15 ; 3	160	20 ; 6
80	14 ; 2	120	20 ; 6
40	12 ; 1	104	20 ; 6
20	12 ; 1	80	18 ; 5

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima do MPV A contendo tintura padronizada de própolis vermelha usando método de difusão em ágar.

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
Concentração (μ g)	Diâmetro do halo de inibição (mm); zona de inibição em (mm)	Diâmetro do halo de inibição (mm); zona de inibição em (mm)
2000	16 ; 4	22 ; 7
1200	16 ; 4	22 ; 7
800	16 ; 4	20 ; 6
640	16 ; 4	20 ; 6
480	12 ; 3	18 ; 5
400	12 ; 3	18 ; 5
320	12 ; 3	18 ; 5
240	12 ; 3	18 ; 5
200	12 ; 3	18 ; 5
160	12 ; 2	16 ; 4

120	12 ; 2	16 ; 4
104	10 ; 1	14 ; 3
80	10 ; 1	14 ; 3

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima do MPV D contendo tintura padronizada de própolis vermelha usando método de difusão em ágar.

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
Concentração (μ g)	Diâmetro do halo de inibição (mm); zona de inibição em (mm)	Diâmetro do halo de inibição (mm); zona de inibição em (mm)
2000	16 ; 4	22 ; 8
1200	16 ; 4	22 ; 6
800	16 ; 4	20 ; 6
640	16 ; 4	20 ; 5
480	12 ; 3	18 ; 5
400	12 ; 3	18 ; 5
320	12 ; 3	18 ; 5
240	12 ; 3	18 ; 5
200	12 ; 3	18 ; 5
160	12 ; 2	16 ; 4
120	12 ; 2	16 ; 2
104	10 ; 2	14 ; 2
80	10 ; 1	14 ; 2

Reivindicações

1. Microencapsulado caracterizado por compreender princípios ativos derivados da própolis vermelha;
2. Microencapsulado, conforme a reivindicação 1, 5 caracterizado por os princípios ativos serem derivados de extratos de própolis vermelha e apresentar porcentagem final de extrato de própolis vermelha entre 25 e 55%;
3. Microencapsulado, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender:
 - 10 a) tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferencialmente entre 20 e 60%;
 - b) diluente em proporção entre 5 e 95%;
 - c) dispersante em proporção entre 5 e 95%;
- 15 d) e promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 5%;
4. Microencapsulado, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender:
 - 20 a) tintura hidroalcoólica padronizada proveniente do extrato bioativo em proporção entre 5 a 95%, preferivelmente entre 20 e 60%;
 - b) diluente em proporção entre 5 e 50%;
 - c) emulsificante em proporção entre 5 e 60%, preferivelmente entre 20 e 45%;

d) e um promotor de fluidez em proporção entre 0,01 e 5%;

5. Microencapsulado, conforme reivindicações 3 e 4, caracterizado por compreender sistema dispersante composto por sistema ternário, preferencialmente composto por 5 gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil;

6. Microencapsulado, conforme reivindicações 1 a 5, caracterizado por apresentar propriedades antiaderentes;

7. Microencapsulado, conforme reivindicações de 1 a 6, caracterizado por conter, entre seus componentes, compostos 10 derivados de própolis vermelha, preferencialmente tintura padronizada de própolis vermelha, para uso no tratamento de infecções bacterianas e processos inflamatórios de origem bacteriana;

8. Microencapsulado, conforme reivindicação 7, 15 caracterizado por conter, entre seus componentes, entre seus componentes, compostos derivados de própolis vermelha, preferencialmente tintura padronizada de própolis vermelha e agentes emulsificantes, para uso no tratamento de infecções bacterianas e processos inflamatórios, causados 20 por preferencialmente bactérias Gram positivas (+) e Gram negativas (-);

9. Processo de obtenção de microencapsulado, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) Preparação do extrato bruto a partir da própolis 25 vermelha;

b) Preparação da tintura hidroalcoólica padronizada a partir do extrato bruto da própolis vermelha;

c) Preparação dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo tintura de própolis vermelha;

5 5 d) Secagem dos sistemas sol-gel e emulsificante e formação dos microencapsulados de própolis vermelha;

10. 10. Processo de obtenção de microencapsulado, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de, na etapa a), uma amostra de própolis ser submetida à completa extração das substâncias ativas, com álcool 60 a 90 °GL, preferencialmente entre 70 a 80 °GL, seja por maceração ou percolação, com posterior concentração em rotaevaporador ou banho-maria e obtenção de material com porcentagem de solvente entre 5 e 35%, preferencialmente entre 5 e 12%;

15. 11. Processo de obtenção de microencapsulado, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de, na etapa b), o extrato bruto é submetido à lavagem com solvente, preferencialmente etanol absoluto, com posterior evaporação total do solvente e 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 15 e 25% (p/v);

20. 12. Processo de obtenção de microencapsulado, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de, na etapa c),

para a preparação dos sistemas ternários contendo a tintura da própolis vermelha serem utilizados: i) composto ativo (tintura hidroalcoólica padronizada), ii) diluentes, iii) promotor de fluidez / antiaderente e iv) dispersante /
5 emulsificante;

13. Processo de obtenção de microencapsulado, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de, na etapa c), para preparação do sistema sol-gel A, são incorporados de uma única vez (*one pot mixture*) ao sistema dispersante ternário, gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil, em temperatura entre 25 e 30 °C, 450 mL de água destilada e 150 mL de tintura hidroalcoólica padronizada de própolis vermelha com 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
10 (60:40, v/v) ou (70:30, v/v) ou (80:20, v/v), preferencialmente entre 20 a 45 °GL e mais preferencialmente de 35 °GL;

14. Processo de obtenção de microencapsulado, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de, na etapa c), para preparação do sistema emulsificante D, são adicionados, sob agitação, ao sistema dispersante ternário, gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil, 550 mL de etanol:água (30:70, v/v) ou (20:80, v/v) ou (10:90, v/v) ou (02:98, v/v), preferencialmente entre (02:98, v/v) a
20 (10:90, v/v), 150 mL da tintura hidroalcoólica padronizada contendo sistema de solvente etanol:água (10:90, v/v) ou (15:85, v/v) ou (20:80, v/v) ou (30:70, v/v) ou (40:60, v/v) ou (50:50, v/v) e preferivelmente entre 10 e 40 °GL,
25

sob temperatura preferencial entre 30 °C e 45 °C e mais preferencialmente a 37 °C;

15. Processo de obtenção de microencapsulado, conforme reivindicação 9, caracterizado pelo fato de, na etapa d),

5 foi preparado pela técnica de formação de um sistema sol-gel usando emulsificantes (gelatina, amido pré-gelatinizado e aerosil) contendo tintura de própolis vermelha, são submetidos a processo de secagem para obtenção de microencapsulado de própolis vermelha;

10 16. Composição, caracterizada por compreender microencapsulados de própolis vermelha como princípio ativo, isoladamente ou em conjunto com outros ativos;

15 17. Composição, conforme reivindicação 16, caracterizada por ser, preferencialmente formulações sólidas, como pós,

15 comprimidos, cápsulas, dentre outras e, mais preferencialmente, na forma de cápsulas gelatinosas;

20 18. Composição, conforme reivindicação 16, caracterizada por compreender i) um núcleo contendo substância(s) ativa(s) de própolis vermelha combinado com excipientes

25 farmacêuticos; ii) uma camada intermediária de revestimento do núcleo que pode retardar a liberação das substância(s) ativa(s) contidas no núcleo e que é dependente do pH; iii) uma camada externa responsável pelos processos lubrificação, diluição, fluidez, molhabilidade e desagregação/dissolução da camada intermediária e núcleo interno;

19. Composição, conforme reivindicação 18, caracterizada por apresentar característica de gastrorresistência;
20. Composição, conforme reivindicação 18, caracterizada por apresentar ou não invólucro de gelatina;
- 5 21. Composição, conforme reivindicação 18, caracterizada por compreender um núcleo (i) composto pelas substâncias ativas da própolis vermelha, derivadas da tintura padronizada da própolis vermelha e excipientes farmacêuticos;
- 10 22. Composição, conforme reivindicação 18, caracterizada por compreender uma camada intermediária (ii) composta por excipientes farmacêuticos, preferencialmente agentes promotores de fluidez e antiaderência, aglutinantes e diluentes, 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 5% e 95%, preferencialmente entre 30 e 75%, em relação ao peso total da composição;
- 20 23. Composição, conforme reivindicação 18, caracterizada por compreender uma camada externa (iii) cuja dissolução é promovida pela mudança de pH, composta por excipientes farmacêuticos, com diversas funcionalidades, preferencialmente diluentes, lubrificantes, agentes promotores da fluidez, molhantes, desintegrantes, super-25 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;

24. Composição, conforme reivindicações 18, 21 a 23, caracterizada por compreender excipientes farmacêuticos de 5 diversos tipos e em formulações diversas;

25. Composição, conforme reivindicação 24, 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, gelatina, amido de milho, amido pré-gelatinizado, gomas xantana, goma guar, goma arábica, estearato de magnésio, talco, dióxido de titânio, polivinilpirrolidone, carbômeros, 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;

20 26. Composição, conforme reivindicações de 16 a 25, caracterizada por conter, entre seus componentes, compostos derivados de própolis vermelha, preferencialmente microencapsulados de própolis vermelha, para uso no tratamento de infecções bacterianas e processos 25 inflamatórios de origem bacteriana;

27. Composição, conforme reivindicações 26, caracterizada por conter, entre seus componentes, entre seus componentes, compostos derivados de própolis vermelha, preferencialmente

microencapsulados da própolis vermelha, para uso no tratamento de infecções bacterianas e processos inflamatórios, causados por preferencialmente bactérias Gram positivas (+) e Gram negativas (-);

5 28. Processo de preparação de composição, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) Realização de misturas físicas com os microencapsulados de própolis vermelha para garantir teor e uniformidade de conteúdo; a.1) Misturas físicas pelo método de diluição

10 geométrica; a.2) Misturas físicas para incorporação de excipientes molhantes e desintegrantes; a.3) Misturas físicas para incorporação de excipientes lubrificantes;

b) Preparação das cápsulas de própolis vermelha;

29. Processo de preparação de composição, conforme

15 reivindicação 28, caracterizado pelo fato de, na etapa a) os microencapsulados de própolis vermelha serem submetidos a misturas físicas, para preparação, preferencialmente, de cápsulas gelatinosas;

30. Processo de preparação de composição, conforme

20 reivindicação 28, caracterizado pelo fato de, na etapa a.1) os microencapsulados são submetidos a processo de mistura pelo método de diluição geométrica com os excipientes do tipo desintegrantes ou superdesintegrantes em proporção entre 0,5 e 15%, preferivelmente entre 1 a 10%, e mais preferivelmente entre 2 a 7%, num tempo compreendido entre 25 5 e 120 minutos, mais preferivelmente entre 25 e 65 minutos;

31. Processo de preparação de composição, conforme reivindicação 28, caracterizado pelo fato de, na etapa a.2) os microencapsulados são misturados com excipientes do tipo agentes molhantes, em proporção entre 0,5 e 10%, preferivelmente entre 1 e 5%, e mais preferivelmente entre 2 e 3,5%, num período de 5 a 120 minutos, mais preferivelmente entre 25 e 65 minutos;

5 32. Processo de preparação de composição, conforme reivindicação 28, caracterizado pelo fato de, na etapa a.3) 10 os microencapsulados são submetidos a excipiente do tipo lubrificante em proporção entre 0,1 e 6%, preferivelmente entre 0,3 a 4%, mais preferivelmente entre 0,75 e 2%, em um período de 2 a 10 minutos, mais preferivelmente entre 3 e 7 minutos;

15 33. Processo de preparação de composição, conforme reivindicação 28, caracterizado pelo fato de, na etapa b) a 20 encapsulação ser realizada ajustando a massa de microencapsulados de própolis vermelha, em termos da tintura padronizada de própolis vermelha, com as seguintes variações: entre 90 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 75 e 115% da percentagem de dissolução para os flavonóides majoritários da tintura padronizada de 25 própolis vermelha, sendo a encapsulação por instrumentos manuais ou instrumentos semi-industriais ou industriais;

34. Uso do microencapsulado, conforme reivindicações 1 a 8, caracterizado por ser isoladamente ou como adjuvante, para

combate a infecções e processos inflamatórios de origem bacteriana;

35. Uso da composição, conforme reivindicações 16 a 27, caracterizado por ser isoladamente ou como adjuvante, para 5 combate a infecções e processos inflamatórios de origem bacteriana.

FIG. 1

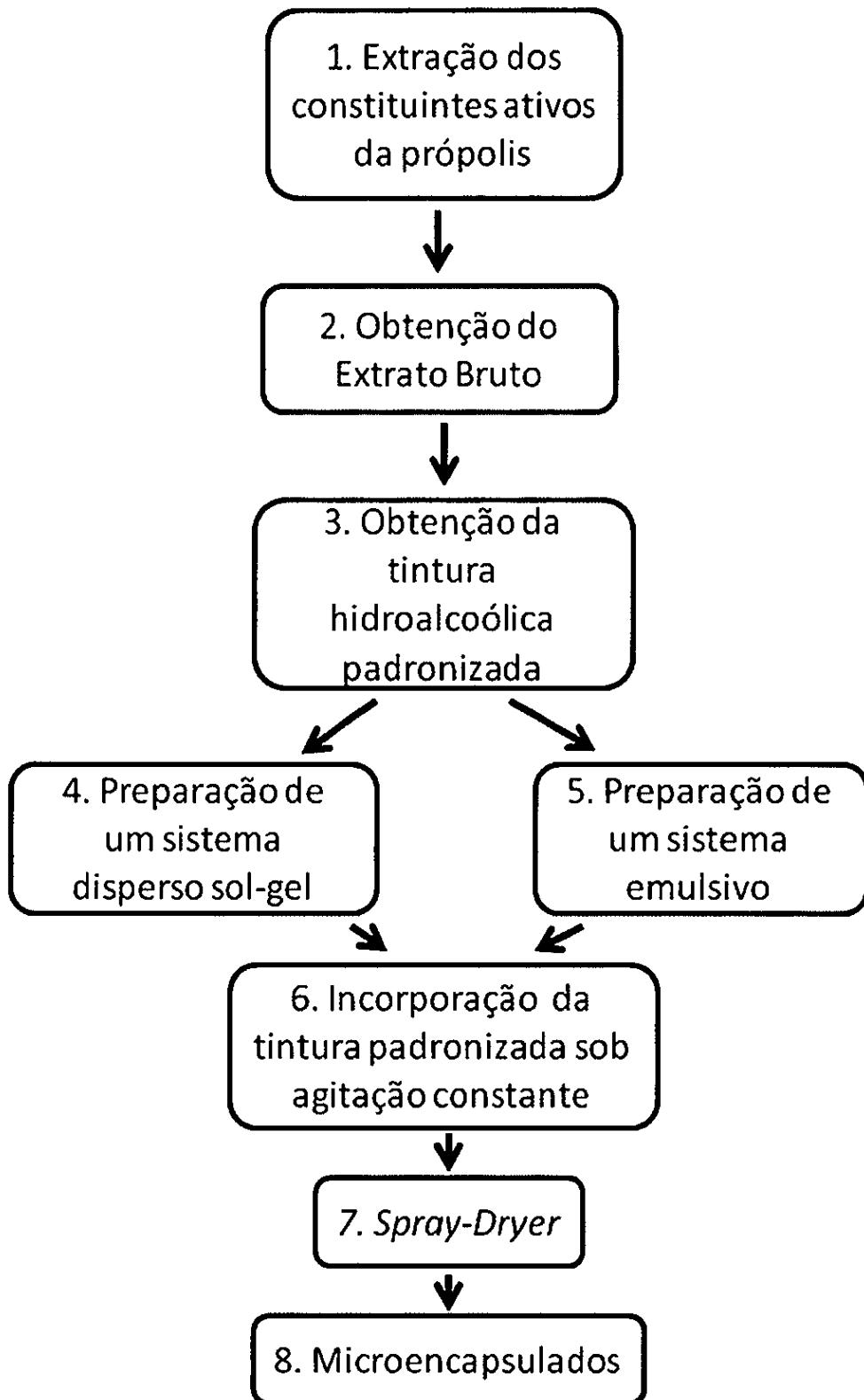


FIG. 2

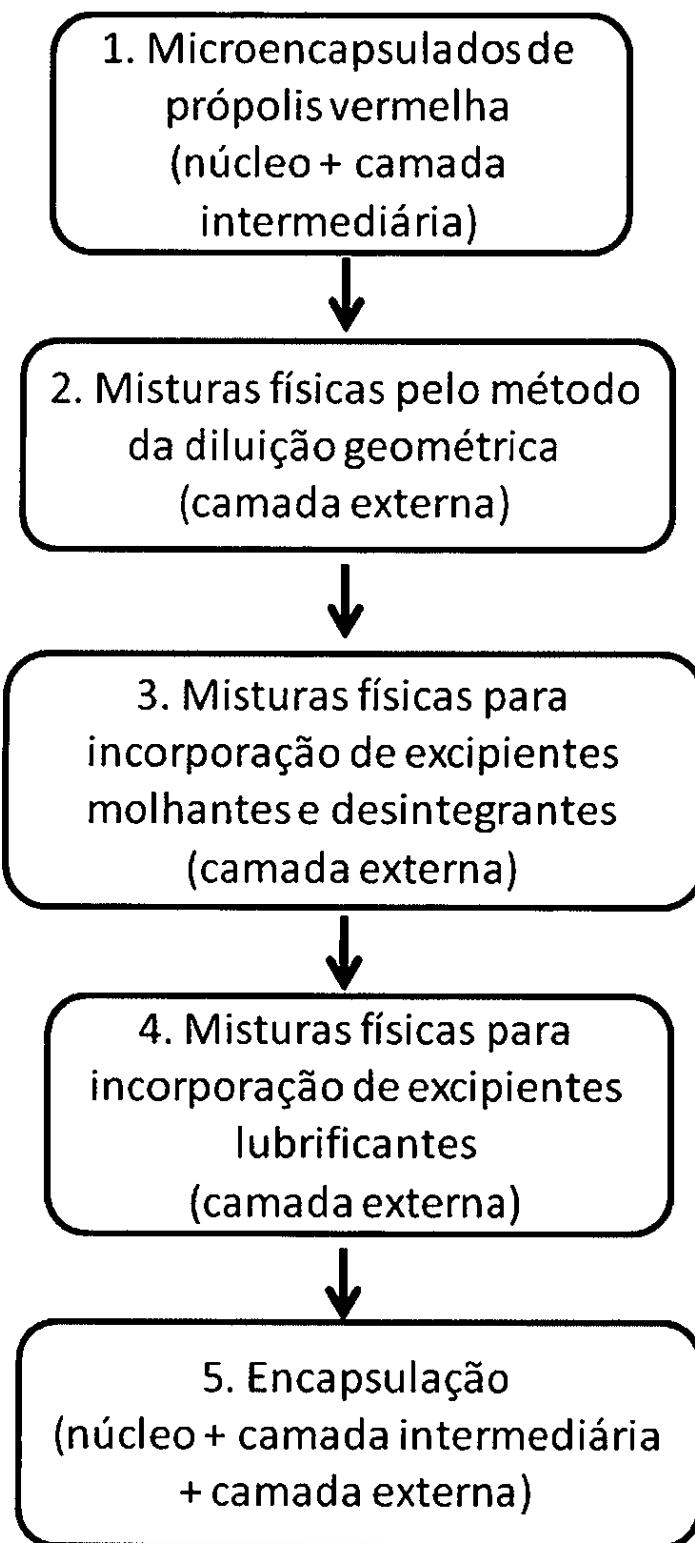


FIG. 3

