



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0801686-0 A2**



* B R P I 0 8 0 1 6 8 6 A 2 *

(22) Data de Depósito: 12/06/2008
(43) Data da Publicação: 26/01/2010
(RPI 2038)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/47 (2010.01)
A61K 31/7004 (2010.01)
A23L 1/03 (2010.01)
A61K 9/28 (2010.01)

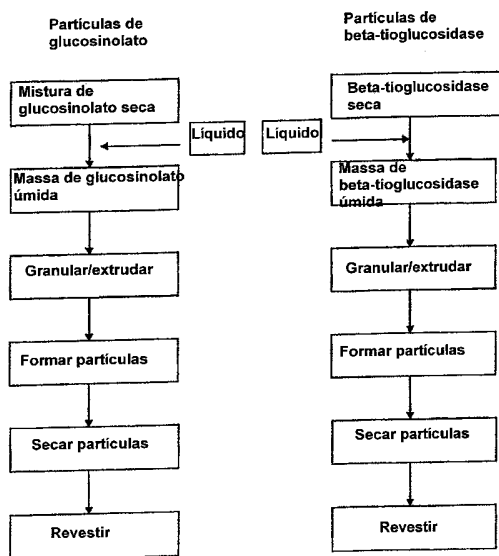
(54) Título: **MÉTODO DE CONVERTER GLUCOSINOLATO A ISOTIOCIANATO NO INTESTINO DELGADO, COMPOSIÇÃO PRECURSORA QUIMIOPROTETORA REVESTIDA ENTERICAMENTE, PRODUTO ALIMENTÍCIO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, CÁPSULA REVESTIDA ENTERICAMENTE**

(30) Prioridade Unionista: 12/06/2007 US 11/761843

(73) Titular(es): Kraft Foods Holdings, INC

(72) Inventor(es): Anilkumar Ganapati Gaonkar, Leslie George West, Nam-Cheol Kim, Nathan V. Matusheski, Nicole Lee Windsor

(57) Resumo: MÉTODO DE CONVERTER GLUCOSINOLATO A ISOTIOCIANATO NO INTESTINO DELGADO, COMPOSIÇÃO PRECURSORA QUIMIOPROTETORA REVESTIDA ENTERICAMENTE, PRODUTO ALIMENTÍCIO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, CÁPSULA REVESTIDA ENTERICAMENTE. A presente invenção refere-se a uma composição particulada compreendendo partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas entericamente. A presente invenção proporciona adicionalmente um método de converter glucosinolato a isotiocianato no intestino delgado, compreendendo administrar oralmente a um sujeito uma composição precursora quimioprotetora revestida entericamente compreendendo partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas entericamente. Em outro aspecto, partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato não revestidas podem ser fornecidas em uma cápsula revestida entericamente. De preferência, o glucosinolato é glucorafanina e a beta-tioglicosidase é mirosinase. O revestimento entérico objetiva liberar o composto no intestino delgado onde enzima beta-tioglicosidase converte glucosinolato a isotiocianato quimioprotetor.





“MÉTODO DE CONVERTER GLUCOSINOLATO A ISOTIOCIANATO
NO INTESTINO DELGADO, COMPOSIÇÃO PRECURSORA
QUIMIOPROTETORA REVESTIDA ENTERICAMENTE, PRODUTO
ALIMENTÍCIO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, CÁPSULA
5 REVESTIDA ENTERICAMENTE”

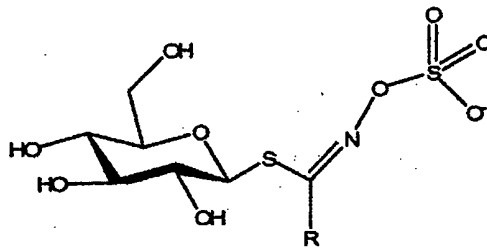
A presente invenção refere-se a uma composição
compreendendo partículas de enzima beta-tioglicosidase revestidas
entericamente e glucosinolato revestido entericamente. A presente invenção
proporciona adicionalmente um método de converter glucosinolato a
10 isotiocianato no intestino delgado compreendendo administrar oralmente a um
sujeito uma composição precursora quimioprotetora revestida entericamente
compreendendo partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas
entericamente. Em outro aspecto, partículas de beta-tioglicosidase e
glucosinolato não revestidas podem ser proporcionadas em uma cápsula
15 revestida entericamente. O revestimento entérico objetiva liberar a
composição precursora quimioprotetora no intestino delgado onde beta-
tioglicosidase converte o glucosinolato a isotiocianato quimioprotetor. Mais
especificamente, a composição precursora quimioprotetora compreende
glucorafanina revestida entericamente e sua enzima de conversão mirosinase.

20 Fundamentos

É consenso geral que a dieta desempenha um papel importante
no controle do risco de desenvolver cânceres e outras doenças e condições,
como úlceras e doença cardiovascular, e que o consumo incrementado de
frutas e hortaliças pode reduzir incidências de câncer em humanos. A
25 presença de determinados componentes químicos menores em plantas pode
proporcionar mecanismos de proteção quando fornecidos a células mamíferas.
Além disso, o fornecimento de farmacêuticos, suplementos nutricionais, ou
alimentos fortificados ou suplementados com componentes químicos para
controle do câncer derivados de plantas pode proporcionar benefícios de

saúde adicionais. Um tendência importante na indústria alimentícia dos E.U.A. é a de promover produtos alimentícios de consciência saudável.

Hortaliças crucíferas contêm precursores fitoquímicos para quimioprotetores potentes, especificamente o precursor glucorafanina (que também é conhecido como glucosinolato de sulforafano ou glucosinolato de 4-metilsulfinilbutila) e seu produtos de conversão enzimática associado sulforafano, que parecem disparar mecanismos de destoxificação de carcinógeno quando fornecidos a células mamíferas. Glucosinolatos são encontrados em plantas dicotiledôneas e, mais comumente, na família de *Brassicaceae* (*Cruciferae*). Glucosinolatos são compostos contendo enxofre com a estrutura geral:



Glucosinolatos inclui um grupo R derivado de aminoácidos e uma ligação tioglucosídica a uma oxima sulfonada. As ligações tioglucosídicas dos glucosinolatos são hidrolisadas com beta-tioglicosidases a glucosinato agliconas instáveis, que sofrem rearranjo espontâneo a isotiocianatos, como sulforafano.

Além de reduzir o risco de determinados cânceres, mostrou-se recentemente que a glucorafanina, através de seu produto de conversão bioativo sulforafano, é eficaz para destruir organismos responsáveis para causar a maior parte de úlceras do estômago e pode proporcionar novas abordagens para reduzir o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e oculares. Esforços estão sendo empenhados para obter aprovação visando oferecer indicações no rótulo em produtos alimentícios que apresentam altos teores destes agentes, ou em alimentos contendo adição de quimioprotetores de crucíferas. Já se encontram no mercado produtos contendo aditivos

quimioprotetores, embora sem referidas indicações no rótulo.

Embora isotiocianatos, particularmente sulforafano, sejam reconhecidos crescentemente como promotores de bem-estar importantes, tipicamente não se usa isotiocianatos em produtos alimentícios ou suplementos devido a seu sabor extremamente pungente. Isotiocianatos também apresentam alta reatividade química, o que torna isotiocianatos candidatos insuficientes para encapsulação.

Para superar os problemas inerentes em isotiocianatos, ao invés, glucosinolatos são proporcionados geralmente em produtos alimentícios e suplementos de saúde. A administração de glucosinolatos sem as enzimas convertedoras ainda resulta na formação de isotiocianatos pela microflora intestinal, mas em níveis substancialmente reduzidos. Embora a dosagem de glucosinolatos possa ser incrementada para reduzir este problema, há um custo considerável envolvido. Acredita-se também que isotiocianatos não são bem absorvidos no estômago, mas, ao contrário, são mais facilmente absorvidos no intestino delgado. Adicionalmente, a formação de isotiocianatos no intestino pode levar à perda de isotiocianatos devido à formação, favorecida por pH baixo, de derivados não-promovedores de saúde, especificamente nitrilas.

Portanto, permanece uma necessidade de formulações mais aperfeiçoadas projetadas para fornecer isotiocianatos no intestino delgado onde os isotiocianatos podem ser facilmente absorvidos. A presente invenção atende esta e também outras necessidades, como se perceberá na descrição de construção da presente invenção, a seguir.

25 Sumário

A presente invenção proporciona partículas de enzima beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas entericamente que são preparadas separadamente ou em combinação por meio de métodos convencionais. Partículas de enzima beta-tioglicosidase e glucosinolatos revestidas

entericamente podem ser preparadas conjuntamente em condições projetadas para reduzir substancialmente a taxa de reação entre o glucosinolato e enzima beta-tioglicosidase. Em outro aspecto, partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato não revestidas podem ser incorporadas em tabletes, cápsulas revestidas entericamente, ou análogos. Durante a digestão, o revestimento entérico permanece intacto enquanto atravessa o estômago e só se dissolve no intestino delgado para liberar as partículas de glucosinolato e beta-tioglicosidase. A enzima beta-tioglicosidase converte glucosinolatos a quimioprotetores de isotiocianato no intestino delgado. O revestimento entérico permite que os glucosinolatos e suas enzimas de conversão cheguem intactos no intestino delgado onde se acredita que a absorção de isotiocianatos é a mais eficiente. De preferência, os glucosinolatos são glucorafanina e as enzimas beta-tioglicosidase são mirosinase, que converte glucorafanina a sulforafano, um quimioprotetor potente.

De uma maneira geral, o método de revestir as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato pode ser realizado facilmente por qualquer meio conhecido na arte. Assim, por exemplo, é possível usar o método a seguir: (1) preparar uma mistura homogênea contendo agente ativo, excipiente de revestimento e, opcionalmente, diluente; (2) adicionar líquido, como água, propileno glicol, glicerol, sorbitol, e misturas dos mesmos, à mistura seca para formar uma massa úmida apropriada para extrusão a úmido; (3) granular e extrudar a massa úmida para formar extrudado; (4) formar partículas do extrudado; e (5) secar as partículas.

Em um aspecto preferido, as partículas na etapa (4) são formadas por meio de esferonização. Em um aspecto particularmente preferido, as partículas formadas na etapa (4) tem forma substancialmente esférica.

As partículas assim formadas podem então ser revestidas com um revestimento entérico. Revestimentos entéricos incluem qualquer barreira

conhecida na arte que é aplicada a medicamentos orais, suplementos alimentícios, ou análogos, que impedem a liberação do agente ativo antes que este atinja o intestino delgado. Revestimentos entéricos previnem a destruição do agente ativo por parte do ambiente ácido no estômago. Alternativamente, partículas não revestidas podem ser envasadas em cápsulas, que são então revestidas com um revestimento entérico. O revestimento entérico nas partículas ou cápsulas proporciona a liberação das partículas de enzima beta-tioglicosidase e glucosinolato no intestino delgado onde a beta-tioglicosidase converte glucosinolatos a isotiocianatos.

10 Revestimentos entéricos vantajosos incluem *shellac*, copolímeros de ácido metacrílico e seus derivados, acetato de celulose, copolímeros de estireno ácido maléico, copolímeros de ácido polimetacrílico/ácido acrílico, ftalato de hidroxipropil metil celulose, ftalato de acetato de polivinila, ftalato de hidroxietil etil celulose, succinato de hidroxipropil metil acetato de celulose, tetraidroftalato de acetato de celulose, resina acrílica, timelitato, zeína, alginato de cálcio, ácidos graxos, gorduras, e combinações dos mesmos, entre outros. Exemplos de revestimentos entéricos comercialmente obteníveis vantajosos incluem, embora sem limitação, MARCOAT®125 da Emerson Resources, Inc. (Norrstown, PA), EUDRAGIT® da Degussa, ou Ftalato de Acetato de Celulose, NF ("CAP" [Cellulose Acetate Phtalate]) da Eastman Chemical Co. (Kingston, TN), ou análogos.

25 Em outro aspecto, proporciona-se produtos alimentícios e farmacêuticos que incluem as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato revestidas entericamente. As partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas entericamente da invenção podem ser usadas numa ampla variedade de aplicações alimentícias, farmacêuticos, ou análogos. As partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas entericamente podem ser incorporadas diretamente ou podem ser processadas

adicionalmente, conforme desejado, antes da incorporação em produtos alimentícios ou farmacêuticos. Produtos alimentícios em que as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato revestidas entericamente podem ser incorporadas incluem suplementos alimentícios, barras nutricionais, cereais, biscoitos, bebidas, bebidas batidas, pílulas, tabletes, misturas em pó para bebidas, e análogos. Suplementos incluem suplementos dietéticos, suplementos nutricionais, suplementos herbáceos, e análogos.

A presente invenção proporciona adicionalmente um método de converter glucosinato a isotiocianato no intestino delgado compreendendo administrar oralmente a um sujeito uma composição precursora quimioprotetora revestida entericamente compreendendo partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato revestidas entericamente. Em outro aspecto, partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato não revestidas podem ser proporcionadas em uma cápsula revestida entericamente. O revestimento entérico objetiva a liberação de uma composição precursora quimioprotetora no intestino delgado onde a beta-tioglicosidase converte o glucosinato a isotiocianato quimioprotetor.

Breve descrição das figuras

FIG. 1 mostra a reação principal para conversão de glucorafanina a sulforafano.

FIG. 2 mostra um gráfico de fluxo ilustrando uma concretização do processo da invenção.

FIG. 3 mostra um gráfico de fluxo ilustrando outra concretização do processo da invenção.

FIG. 4 mostra um gráfico de fluxo ilustrando outra concretização do processo da invenção.

FIG. 5 ilustra várias concretizações de partículas revestidas. Parte A ilustra uma partícula individual, compreendendo ou glucosinato ou beta-tioglicosidase, e que é revestida com um revestimento. Parte B ilustra

uma pluralidade de partículas de um tipo individual, compreendendo ou glucosinolato ou beta-tioglicosidase, revestidas em conjunto com um revestimento. Parte C ilustra uma pluralidade de partículas de mais de um tipo, compreendendo tanto glucosinolato como também beta-tioglicosidase, revestidas com uma camada de revestimento.

Descrição detalhada

A presente invenção refere-se a partículas de enzima beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas entericamente. De uma maneira geral, o glucosinolato pode ser glucorafanina, glucorafenina, glucoerucina, e análogos, ou uma combinação dos mesmos. Em um aspecto preferível, o glucosinolato é glucorafanina e a enzima beta-tioglicosidase é mirosinase, que converte glucorafanina a sulforafano, um quimioprotetor. As partículas de enzima beta-tioglicosidase e glucosinolatos revestidas entericamente podem ser produzidas separadamente ou em combinação, por meio de métodos convencionais. Alternativamente, partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato não revestidas podem ser combinadas e incorporadas em cápsulas revestidas entericamente.

A presente invenção refere-se adicionalmente a um método de converter glucosinolato a isotiocianato no intestino delgado compreendendo administrar oralmente a um sujeito uma composição precursora quimioprotetora revestida entericamente compreendendo partículas de glucosinolato revestidas entericamente e partículas de beta-tioglicosidase revestidas entericamente. Alternativamente, as partículas de glucosinolato e partículas de beta-tioglicosidase podem ser revestidas ou não revestidas e proporcionadas em uma cápsula revestida entericamente.

Uma vantagem significativa de uma formulação compreendendo partículas de glucosinolato e beta-tioglicosidase revestidas entericamente é que o revestimento entérico permite que glucosinolatos e as beta-tioglicosidases cheguem intactas no intestino delgado onde se acredita

que a absorção de isotiocianatos é a mais eficiente. Quando fornecida no intestino delgado, a enzima das partículas de beta-tioglicosidase revestidas entericamente proporcionadas, ou as partículas de beta-tioglicosidase das cápsulas revestidas entericamente proporcionadas, são liberadas e convertem
5 as partículas de glucosinato proporcionadas em quimioprotetores de isotiocianato. De preferência, o glucosinato é glucorafanina e a enzima beta-tioglicosidase é mirosinase, que converte glucorafanina a sulforafano, um quimioprotetor potente. A reação principal é ilustrada na FIG. 1.

Como usado aqui, "quimioprotetores" e "compostos
10 quimioprotetores" referem-se a agentes de origem vegetal que são efetivos para reduzir a suscetibilidade de mamíferos aos efeitos tóxicos e neoplásicos de carcinógenos. "Precursores" quimioprotetores referem-se a agentes que dão origem a quimioprotetores por vias enzimáticas e/ou químicas. Talalay, P. *et al.*, *J. Nutr.*, 131 (11 Supl.): 30275-30335 (2001). Exemplos de referidos
15 protetores quimioprotetores incluem glucosinatos de alquila, como glucorafanina.

Como usado aqui, "agente ativo" significa glucosinatos, de preferência, glucorafanina e/ou enzima beta-tioglicosidase, de preferência, mirosinase, ou uma mistura dos mesmos.

20 Como usado aqui, "quantidade eficaz" é uma quantidade de agente ativo que proporciona o efeito ou benefício desejado após quando consumido. De uma maneira geral, cerca de 1 a cerca de 100 mg de glucosinato, de preferência, glucorafanina, e cerca de 1 a cerca de 100 mg de beta-tioglicosidase, de preferência, mirosinase, por porção servida
25 individual do produto alimentício ou composição farmacêutica, poderiam ser considerados efetivos.

Glucosinatos derivados de brotos ou sementes de crucíferas são materiais de partida úteis. Verificou-se que sementes e brotos de crucíferas são uma fonte particularmente boa de precursores

quimioprotetores. Sementes e brotos de crucíferas que são particularmente úteis incluem brócolis, couve, couves verdes, couve crespa, marrowstem kale/couve [*brássica oleracea* var. *acephala*], couve de mil cabeças, couve chinesa, couve-flor, couve portuguesa, couve de Bruxelas, couve-rábano, 5 couve de Jersey, repolho [*Brassica oleracea*, grupo *Capitata*], couves verdes, couve da variedade acéfala, rabanete, e análogos, e também misturas dos mesmos. Em um aspecto muito importante, usa-se sementes de crucíferas ou sementes e brotos de brócolis.

Extratos ou isolados de glucosinolato podem ser preparados de 10 uma maneira geral por qualquer meio conhecido na arte e podem incluir os métodos divulgados nos Pedidos dos E.U.A. co-pendentes com números de série 11/617.934, depositado em 29 de dezembro de 2006, e 11/199.752, depositado em 9 de agosto de 2005, e 11/ ___ (docket 77523, depositado no mesmo dia que este pedido), designados em comum ao requerente aqui e são 15 incorporados por referência como se reproduzidos aqui integralmente.

De uma maneira geral, partículas de beta-tioglicosidase de glucosinolato são preparadas por meio do método que compreende: (1) preparar uma mistura homogênea de agente ativo, excipiente de revestimento, 20 opcionalmente diluente, e opcionalmente ativador de enzima; (2) adicionar líquido, como água, propileno glicol, glicerol, sorbitol, ou misturas dos mesmos, de preferência, água, à mistura seca para formar uma massa úmida vantajosa para extrusão a úmido; (3) granular e extrudar a massa úmida para formar extrudado; (4) formar partículas do extrudado; e (5) secar as partículas. Aqueles com prática ordinária na arte compreenderão que há 25 vários processos conhecidos na arte para formação de partículas do extrudado, particularmente a formação de partículas vantajosas para revestimento, como revestimento de leito fluidizado, disco rotativo, secagem por pulverização, e análogos. As partículas secas podem então ser revestidas com um revestimento entérico, ou podem ser envasadas em uma cápsula que, então, é

revestida com um revestimento modificador de liberação, de preferência, um revestimento entérico.

Em uma concretização, como mostrado na FIG. 2, as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato são produzidas e revestidas separadamente para prevenir reação entre os glucosinolatos e enzimas de beta-tioglicosidase durante o processamento. Uma vez revestidas, as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas podem ser misturadas entre si, de preferência, numa relação de cerca de 1:100 a cerca de 100:1, mais preferivelmente de cerca de 1:10 a cerca de 10:1, embora seja possível usar outras relações, se desejado. Alguém com prática na arte saberá que a relação usada pode depender das purezas relativas das fontes de glucosinolato e beta-tioglicosidase usadas. Esta relação proporciona uma relação de enzima para substrato tal que a reação de conversão pode ocorrer a uma taxa suficiente, enquanto a enzima e substrato permanecem no intestino delgado.

Em outra concretização, como mostrado na FIG. 3, partículas de glucosinolato e beta-tioglicosidase podem ser produzidas separadamente e, depois, combinadas para formar uma mistura após a etapa de secagem (5) e antes do revestimento. De uma maneira geral, as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato são combinadas numa relação de cerca de 1:100 a cerca de 100:1, de preferência, de cerca de 1:10 a cerca de 10:1, embora seja possível usar outras relações de partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato, se desejado.

Em outra concretização, como mostrado na FIG. 4, partículas de glucosinolato e beta-tioglicosidase podem ser produzidas em conjunto iniciando na etapa (1) se as condições de processamento forem ajustadas e/ou conservadas de forma a reduzir substancialmente a similaridade das enzimas de beta-tioglicosidase que catalisam a conversão de glucosinolatos a isotioglicosidases. Neste aspecto, glucosinolatos e beta-tioglicosidases

podem ser combinados quando da formação da mistura homogênea da etapa (1) se, quando se adiciona líquido na etapa (2), o pH for ajustado a cerca de 2 a cerca de 3 e a temperatura for ajustada a cerca de 0 a cerca de 15°C de forma a reduzir substancialmente a taxa de conversão de glucosinolatos a isotiocianatos. A temperatura nesta faixa poderia ser mantida até que as partículas de glucosinolato e beta-tioglucoxidase sequem.

Os agentes ativos são glucosinolato, beta-tioglucoxidase, ou uma mistura dos mesmos. Os agentes ativos encontram-se geralmente em forma de um isolado, isolado purificado, isolado semi-purificado, extrato seco ou análogos. De preferência, o glucosinolato é glucorafanina e a enzima beta-tioglucoxidase é mirosinase.

O excipiente de revestimento pode compreender celulose microcristalina, lactose, fibra de aveia, carbóxi metil celulose, derivados dos mesmos, análogos, ou misturas dos mesmos. De preferência, o recipiente de revestimento é um agente esferonizador. O agente esferonizador pode ser qualquer agente esferonizador conhecido na arte, como celulose microcristalina e seus derivados, fibra de aveia, carbóxi metil celulose, derivados dos mesmos, análogos, ou misturas dos mesmos. Mais preferivelmente, o agente esferonizador é celulose microcristalina, como Celulose microcristalina GP-1030 da FMC BioPolymer (Philadelphia, PA). O agente esferonizador proporciona plasticidade à mistura de forma a permitir a formação e proporcionar resistência às partículas uma vez formadas.

As partículas podem incluir opcionalmente diluente. O diluente pode incluir qualquer substância inerte, de classe alimentícia, ou farmacologicamente aceitável, como lactose, amido, dextrina, água, glicerol, sorbitol, propileno glicol, análogos, ou uma mistura dos mesmos. O diluente também pode funcionar como um ligante. Lactose pode servir como um excipiente de revestimento ou um diluente. De preferência, o diluente é lactose.

Opcionalmente, é possível incluir um ativador de enzima na mistura de agente ativo. O ativador de enzima pode compreender ácido ascórbico e seus derivados. De preferência, o ativador de enzima é ácido ascórbico. Após digestão e dissolução do revestimento entérico, o ativador de enzima aumenta a taxa de reação entre beta-tioglicosidase e glucosinolato.

Como descrito acima, pode ser desejável preparar partículas de glucosinolato e beta-tioglicosidase separadamente, como ilustrado nas FIGS. 2 e 3, ou em combinação, como ilustrado na FIG. 4.

De uma maneira geral, para preparar uma mistura de agente ativo compreendendo beta-tioglicosidase, de cerca de 1 a cerca de 50 por cento de beta-tioglicosidase são misturados com cerca de 50 a cerca de 99 por cento de uma composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente para formar uma mistura de beta-tioglicosidase. De preferência, de cerca de 20 a cerca de 30 por cento de beta-tioglicosidase são misturados com cerca de 70 a cerca de 80 por cento de composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente. Em um aspecto particularmente preferido, a mistura também inclui cerca de 0,001 a cerca de 10 por cento de ativador de enzima, de preferência, ácido ascórbico.

De uma maneira geral, para preparar uma mistura de agente ativo mistura glucosinolato, cerca de 1 a cerca de 50 por cento de glucosinolato são misturados com cerca de 50 a cerca de 99 por cento de composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente para formar uma mistura seca de glucosinolato. De preferência, de cerca de 20 a cerca de 30 por cento de glucosinolato são misturados com cerca de 70 a cerca de 80 por cento de composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente.

De uma maneira geral, para preparar uma mistura de agente ativo compreendendo tanto glucosinolato como também beta-tioglicosidase, a mistura é preparado combinando-se cerca de 0,5 a cerca de 50 por cento de

beta-tioglicosidase, de cerca de 0,5 a cerca de 50 por cento de glucosinato, e de cerca de 1 a cerca de 99 por cento de composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente. De preferência, a mistura é preparada combinando-se de cerca de 0,5 a cerca de 25 por cento de

5 beta-tioglicosidase, de cerca de 0,5 a cerca de 25 por cento de glucosinato, e de cerca de 50 a cerca de 99 por cento de composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente. Mais preferivelmente, de cerca de 10 a cerca de 15 por cento de beta-tioglicosidase são misturados com de 10 a cerca de 15 por cento de glucosinato, e de cerca de 70 a cerca

10 de 80 por cento de composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente. Em um aspecto particularmente preferido, a mistura também inclui cerca de 0,001 a cerca de 10 por cento de ativador de enzima, de preferência, ácido ascórbico.

Os ingredientes da mistura de agente ativo podem ser

15 combinados em qualquer ordem vantajosa. A mistura resultante é agitada, misturada, combinada, ou agitada com qualquer meio apropriado até formar-se uma mistura seca homogênea.

A mistura de agente ativo também pode apresentar componentes ou ingredientes opcionais introduzidos, como, por exemplo,

20 nutrientes, vitaminas, colorantes, aditivos nutracêuticos, antioxidantes, probióticos, prebióticos, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes de processamento, ou análogos, desde que não afetem adversamente o processamento ou as propriedades de estabilidade de uma maneira significativa. De uma maneira geral, estes componentes ou ingredientes

25 opcionais compreendem de cerca de 0,1 a cerca de 10 por cento.

De preferência, a mistura seca homogênea é formada antes do umedecimento com um líquido, embora os ingredientes secos e líquidos possam ser combinados e misturados sem formar primeiramente uma mistura seca homogênea. De uma maneira geral, forma-se uma mistura (massa)

melhor e mais homogênea quando a mistura seca homogênea é formada antes da molhagem. A mistura seca é molhada com um líquido, como água, glicerol, propileno glicol, sorbitol, álcool, análogos, ou misturas dos mesmos. De preferência, o líquido é água a uma temperatura de cerca de 0 a cerca de 5 15°C. A quantidade de líquido adicionada à mistura seca é a quantidade mínima requerida para preparar uma massa extrudável. Quando se usa esferonização para preparar as partículas, o tamanho das partículas produzidas durante a esferonização é amplamente determinado pela quantidade de líquido adicionado para produzir a massa úmida. A quantidade de líquido também 10 afeta a distribuição de tamanhos de partículas e as características de deformabilidade plástica das partículas. As partículas precisam apresentar suficiente plasticidade para permitir deformação durante colisões, mas ainda devem ser suficientemente fortes para não se partirem durante a esferonização (i.e., líquido demais ocasiona que a massa extrudada não se quebre formando 15 partículas esféricas, embora líquido de menos causa que a massa úmida se esmigalhe e fragmente em um pó fino na esferonização).

De uma maneira geral, a mistura de beta-tioglicosidase é umedecida com um líquido a um percentual em massa úmida de cerca de 10 a cerca de 50 por cento, de preferência, de cerca de 20 a cerca de 40 por cento, 20 para formar uma massa úmida de agente ativo.

De uma maneira geral, a mistura de glucosinolato é umedecida com um líquido a um percentual de massa úmida de cerca de 10 a cerca de 50 por cento, de preferência, de cerca de 20 a cerca de 40 por cento, para formar uma massa úmida de agente ativo.

25 De uma maneira geral, a mistura de glucosinolato e beta-tioglicosidase é umedecida com um líquido a um percentual de massa úmida de cerca de 10 a cerca de 50 por cento, de preferência, cerca de 20 a cerca de 40 por cento, para formar uma massa úmida de agente ativo.

A massa úmida de agente ativo é então granulada e extrudada

usando-se um granulador convencional, como o multi-granulador de rosca única MG-55 Single-Screw Multi-Granulator distribuído pela LCI Corporation (Charlotte, NC). Cada massa úmida de agente ativo é introduzida separadamente através do alimentador e granulada a uma velocidade rotacional da rosca de cerca de 20 a cerca de 100 rpm, embora a extrusora equipada com a placa (ou tela) extrusora apropriada para formar um extrudado cilíndrico. De uma maneira geral, o diâmetro do extrudado determina o tamanho das partículas. De preferência, usa-se uma placa extrusora de 0,8 mm/0,8T *dome* para formar o extrudado.

O extrudado é então formado em partículas por meio de qualquer método convencional, como por meio de revestimento em leito fluidizado, disco rotativo, secagem por pulverização, ou análogos. As partículas assim formadas podem ter qualquer forma, como esférica, esferóide, angular, tabular, irregular, elipsóide, discóide, em forma de haste, ou análogos, embora seja preferível que as partículas apresentem forma e tamanho substancialmente uniformes. De preferência, as partículas têm diâmetros de cerca de 100 a cerca de 1500 μm , mais preferivelmente de cerca de 200 a cerca de 800 μm . Em um aspecto particularmente preferido, as partículas são formadas por meio de esferonização. Esferonização é um método comumente usado para produzir partículas vantajosas para revestimento. De uma maneira geral, partículas esferonizadas apresentam um tamanho e forma uniformes, e apresentam uma baixa relação de área superficial para volume. As partículas esferonizadas podem ser esferas, esferóides, hastes arredondadas, embora, de preferência, as partículas esferonizadas têm forma de esfera. Partículas esferonizadas também apresentam uma superfície lisa que é ideal para revestimento. Partículas esferonizadas podem ser revestidas uniformemente com uma quantidade mínima de material de revestimento. Referido revestimento uniforme contribui para proporcionar liberação uniforme entre as partículas no intestino

delgado. O extrudado é processado em equipamento esferonizador convencional, p. ex., Marumerizer modelo QJ-230T, fabricado pela Fuji Paudal (Osaka, Japão) e distribuído pela LCI Corporation (Charlotte, NC). O equipamento esferonizador degrada o extrudado cilíndrico em partículas pequenas e tende a arredondar as partículas. A velocidade usada para o disco de atrito rotativo no equipamento esferonizador depende do tamanho de partículas desejado para as partículas. De uma maneira geral, a produção de partículas menores requer velocidades maiores do que a produção de partículas maiores. Os extrudados são esferonizados a uma velocidade do disco de cerca de 500 a cerca de 3000 rpm durante cerca de 1 a cerca de 5 minutos ou até que as partículas apresentem tamanhos e formas substancialmente uniformes. Após cerca de 1 a cerca de 5 minutos, as partículas úmidas são descarregadas em um receptáculo apropriado. As partículas assim formadas são idealmente adequadas para revestimento em virtude da forma uniforme, substancialmente lisa.

As partículas úmidas são coletadas e secadas via qualquer meio convencional na arte, como por meio de secagem em leito fluido, secagem com tambor, secagem por congelamento, secagem em bandeja, estufa convencional, ou análogos. De preferência, as partículas úmidas são secadas por meio de fluidização. Por exemplo, as partículas podem ser fluidizadas a cerca de 35°C a cerca de 70°C durante cerca de 10 a cerca de 60 minutos em um secador de leito fluido convencional, como um Mini-Glatt (distribuído pela Glatt Air Techniques, Inc., Ramsey, NJ).

As partículas assim formadas podem então ser revestidas de forma a modificar as propriedades de liberação das partículas, como com um revestimento de liberação retardada, revestimento de liberação sustentada, revestimento de liberação controlada, revestimento de liberação objetivada, revestimento entérico, e análogos, ou combinações dos mesmos. O revestimento pode compreender adicionalmente lecitina, que serve como um

agente anti-adesão. De preferência, as partículas são revestidas com um revestimento entérico. Revestimentos entéricos incluem qualquer barreira conhecida na arte que é aplicada em medicamentos orais, suplementos alimentícios, ou análogos, e que previnem a liberação do agente ativo antes
5 que este atinja o intestino delgado. Revestimentos entéricos impedem a destruição do agente ativo pelo ambiente ácido do estômago. Tipicamente, revestimentos entéricos são estáveis em pH muito ácido, como no estômago, e degradam-se rapidamente em pH brandamente ácido ou mais elevado, como no intestino delgado. Revestimentos entéricos vantajosos incluem, embora
10 sem limitação, shellac, como MARCOAT®125 da Emerson Resources, Inc. (Norristown, PA), copolímeros de ácido metacrílico e seus derivados, como EUDRAGIT® da Degussa, acetato de celulose, como Ftalato de Acetato de Celulose, NF ("CAP") da Eastman Chemical Co. (Kingston, TN), copolímeros de estireno ácido maléico, copolímeros de ácido
15 polimetacrílico/ácido acrílico, ftalato de hidroxipropil metil celulose, ftalato de acetato de polivinila, ftalato de hidroxietil etil celulose, succinato de hidroxipropil metil acetato de celulose, tetraidroftalato de acetato de celulose, resina acrílica, trimelitato, zeína, alginato de cálcio, ácidos graxos, gorduras, e combinações dos mesmos, entre outros.

20 O revestimento entérico é formado ou depositado nas superfícies exteriores das partículas de uma maneira em que o revestimento entérico encapsula substancialmente as partículas. "Encapsulação" ou expressão equivalente significa que o revestimento entérico formado nas partículas cobre substancialmente toda a superfície exterior das partículas. A
25 extensão da encapsulação com o revestimento entérico precisa ser suficiente para que os agentes ativos não sejam expostos exageradamente aos sucos gástricos do estômago durante o consumo, de forma que as partículas de glucosinolato e beta-tioglicosidase sejam liberadas no intestino delgado.

De preferência, o revestimento tem espessura uniforme para

proporcionar substancialmente uma taxa de liberação uniforme entre as partículas. De uma maneira geral, "espessura uniforme" deve significar que a espessura do revestimento não varie em mais de cerca de 50 por cento, e, de preferência, em não mais de cerca de 25 por cento. O revestimento é aplicado
5 geralmente de forma a proporcionar de cerca de 10 a cerca de 40 por cento com base no peso das partículas secadas.

Exemplos não-limitantes de partículas revestidas são ilustradas na FIG. 5. As partículas podem ser revestidas de forma que apenas uma única
10 partícula 10, compreendendo ou glucosinolato ou beta-tioglucoxidase, seja revestida com um revestimento 12, como mostrado na FIG. 5A, ou de forma que a uma pluralidade de partículas 20 de um único tipo, compreendendo ou glucosinolato ou beta-tioglucoxidase, são revestidas juntamente com um revestimento 22, como mostrado na FIG. 5B. Pode-se desejar que partículas de glucosinolato 30 e partículas de beta-tioglucoxidase 32 sejam combinadas e
15 revestidas juntamente com um revestimento 34, como mostrado na FIG. 5C.

Em uma concretização, as partículas são revestidas com uma composição de revestimento entérico suspendendo-se as partículas em um leito fluido e pulverizando-se as mesmas com a composição de revestimento, seguido de secagem, e recuperando-se as partículas revestidas. Sistemas de
20 revestimento de leito fluido podem incluir sistemas de pulverização de topo, sistemas de pulverização de fundo, sistemas de pulverização tangencial (rotor), e análogos. Processadores de leito fluido de múltiplas utilidades vantajosos também são conhecidos geralmente para aplicações de revestimento de partículas que permitem instalar facilmente diferentes tipos de insertos de bicos de pulverização em um sistema de pulverização comum,
25 de forma que o mesmo processador pode ser operado para se aplicar um revestimento de formas variadas como um spray de topo, spray de Wurster, ou spray tangencial. Também é possível usar um sistema de revestimento compreendendo um revestimento em tambor rotativo. Evidentemente,

também é possível usar outros sistemas de revestimento ou aplicação, incluindo coextrusão e processamento de película. Estes processos de revestimento podem ser operados continuamente ou em forma de bateladas. Equipamentos vantajosos para aplicação do revestimento em partículas com estes tipos de sistemas de pulverização são comercialmente obteníveis. Por exemplo, é possível usar revestidores de spray de topo e de leito fluido de spray de fundo vantajosos obteníveis da Glatt Air Techniques, Inc. (Ramsey, NJ), ou podem ser facilmente adaptados para uso na aplicação do revestimento das partículas. Se desejado, é possível aplicar camadas de revestimento adicionais que podem conter, se desejado, diferentes combinações de ingredientes ou revestimentos modificadores de liberação.

Quando da ingestão ou colocação em um ambiente com pH muito baixo (como no suco gástrico no estômago), o revestimento entérico não se dissolve facilmente. Em lugar disso, o revestimento entérico dissolve-se em pH mais elevado, como no intestino delgado. À medida que o revestimento entérico começa a dissolver-se, as enzimas de beta-tioglicosidase e glucosinolatos são liberadas de forma que as beta-tioglicosidases catalisam a conversão de glucosinolato a isotiocianatos.

Após revestimento, as partículas são secadas via qualquer meio conhecido na arte, como por meio de fluidificação, secagem em tambor, secagem em bandeja, secagem em vácuo, estufa convencional, ou análogos, embora fluidização seja preferida. De uma maneira geral, as partículas deveriam conter menos de cerca de 5 por cento de umidade.

As partículas revestidas entericamente da invenção podem ser formuladas numa variedade de composições, como tabletes comprimidos, pílulas, cápsulas, losangos, farmacêuticos, ou análogos. Em um aspecto particular, as partículas revestidas entericamente da invenção podem ser processadas adicionalmente em tabletes por meio de combinação das partículas com ligantes de tabletização convencionais, como amido, gelatina,

açúcar (como glicose, frutose, lactose, e análogos), análogos, ou misturas dos mesmos. Os ligantes de tabletes deveriam ser ingredientes de classe alimentícia ou farmacologicamente aceitáveis. Na preparação destas composições, as proporções das partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato não são particularmente limitadas desde que apresentam quantidades suficientes de cada componente respectivo na composição para conservar sua finalidade intencionada respectiva. Ou seja, deveria-se incluir suficientes partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato de tal forma se obter a desejada conversão de glucosinatos a isotiocianatos por meio das enzimas beta-tioglicosidase quando da liberação das partículas no intestino delgado. De preferência, as partículas de beta-tioglicosidase e as partículas de glucosinato da invenção deveriam ser proporcionadas numa relação de cerca de 100:1 a cerca de 1:100, de preferência, de 10:1 a cerca de 1:10. A espessura do revestimento nas composições deveria ser suficiente para proporcionar a liberação desejada tanto das partículas de glucosinato como também das partículas de beta-tioglicosidase de tal forma que ambos os componentes sejam disponíveis para reação no intestino delgado substancialmente ao mesmo tempo. De preferência, o revestimento tem espessura uniforme para proporcionar uma taxa substancialmente uniforme de liberação entre as partículas. De uma maneira geral, "espessura uniforme" deve significar que a espessura do revestimento não varia em mais de cerca de 50 por cento, e, de preferência, em não mais de cerca de 25 por cento. De uma maneira geral, o revestimento tem espessura superior a cerca de 10 microns, de preferência, de cerca de 20 a cerca de 40 microns.

As partículas revestidas entericamente da invenção também podem ser incorporadas em produtos alimentícios. As partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato revestidas entericamente podem ser incorporadas diretamente em produtos alimentícios ou podem ser processadas adicionalmente, como desejado, antes da incorporação em produtos

alimentícios ou farmacêuticos. Produtos alimentícios nos quais as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato revestidas entericamente podem ser incorporadas incluem suplementos alimentícios, barras nutricionais, cereais, biscoitos, bebidas, bebidas batidas, pílulas, tabletes, misturas em pó para 5 bebidas, e análogos, e também misturas dos mesmos. Suplementos incluem suplementos dietéticos, suplementos nutricionais, suplementos herbáceos, e análogos, e também misturas dos mesmos. De preferência, produtos alimentícios contendo as partículas de glucosinato e beta-tioglicosidase revestidas entericamente invenção contêm uma relação de partículas de beta- 10 tioglicosidase para partículas de glucosinato de cerca de 100:1 a cerca de 1:100, de preferência, de 10:1 a cerca de 1:10. De uma maneira geral, os produtos alimentícios ou farmacêuticos contêm de cerca de 1 a cerca de 100 mg de glucosinato partículas, de preferência, glucorafanina, e de cerca de 1 a cerca de 100 mg de partículas de beta-tioglicosidase, de preferência, 15 mirosinase, por dose individual do produto alimentício ou farmacêutico.

Em outro aspecto, uma quantidade eficaz de partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato não revestidas pode ser envasada em cápsulas, como cápsulas de gelatina, cápsulas à base de plantas, ou análogos. As partículas de beta-tioglicosidase não revestidas e partículas de glucosinato 20 não revestidas podem ser misturadas entre si, de preferência, numa relação de cerca de 1:100 a cerca de 100:1, mais preferivelmente de cerca de 1:10 a cerca de 10:1, embora se possível usar, se desejado, outras relações. Opcionalmente, as partículas não revestidas podem ser misturadas com ingredientes de carga, como lactose, ou outros medicamentos, como 25 vitaminas, minerais, ou análogos, antes de serem envasadas em cápsulas. As cápsulas, tabletes, ou cápsulas pequenas são então revestidos com um revestimento entérico via qualquer meio convencional, como por meio de revestimento por imersão, revestimento por pulverização, revestimento por pincelamento, revestimento com bacia, revestimento em leito fluidizado,

recobrimento, ou análogos. De uma maneira geral, a espessura do revestimento é superiora a cerca de 10 microns, de preferência, de cerca de 20 a cerca de 40 microns. De uma maneira geral, o revestimento é aplicado de forma a proporcionar um revestimento de cerca de 5 a cerca de 15 por cento, de preferência, de cerca de 8 a cerca de 12 por cento em peso. Novamente, é preferível que o revestimento tenha espessura uniforme para proporcionar uma taxa substancialmente uniforme de liberação entre as partículas.

Os exemplos a seguir devem servir para ilustrar a invenção e não limitá-la. Exceto se indicado de outra forma, percentuais e relações são em peso nesta descrição.

Exemplos

Exemplo 1: Partículas de glucosinato e mirosinase revestidas entericamente

A) Criação de partículas de glucosinato e beta-tioglicosidase

A produção de partículas de glucosinato e beta-tioglicosidase pode ser realizada geralmente usando-se quatro etapas seqüenciais. A primeira destas etapas é a formulação e criação de uma mistura compactável. Após esta etapa, a mistura é introduzida em um granulador/extrusora para criar um extrudado compacto. O extrudado resultante é então introduzido no equipamento de esferonização para formar partículas de glucosinato ou beta-tioglicosidase. As partículas são recuperadas e então secadas em um leito fluidizado.

Partículas de mirosinase

Lactose refinada da Davigco Foods International, Inc. (Eden Prairie, Minnesota) a 35 por cento, e celulose microcristalina GP-1030 da FMC BioPolymer (Philadelphia, PA) a 45 por cento foram combinadas com extrato de sementes de mostarda branca (Palmieri *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 34: 138-140 (1986)) a 20 por cento. O extrato de sementes de mostarda branca contém mirosinase, com uma atividade específica de 300 nmol/min/mg de proteína. Inicialmente, os ingredientes secos foram

misturados em tambor de tombamento entre si em um vaso de pesagem em plástico e, então, colocados em um misturador de pedestal Hobart (modelo N-50, fabricado pela Hobart Manufacturing Company (Troy, OH)) e misturados até a mistura tornar-se homogênea. Sob misturação contínua, a mistura seca combinada homogeneamente foi então molhada lentamente com água fria (cerca de 20°C) usando-se uma pipeta descartável de 5 ml a um percentual em massa úmida de 36 por cento. Após a adição de água, aumentou-se o ajuste de velocidade do misturador Hobart para vinte segundos para formar uma massa úmida.

10 Partículas de glucosinolato

Lactose refinada a 28,5 por cento e celulose microcristalina GP-1030 a 52,0 por cento foram combinados com glucosinolato (produzidos por meio do método descrito no Pedido dos E.U.A. com nº de série 11/199.752 para West *et al.*, que é incorporado aqui integralmente por referência) a um percentual em peso de 19,5 por cento com o mesmo método descrito acima. A mistura foi molhada com água fria a um percentual de massa úmida de 36 por cento. Após adição de água, a velocidade do misturador Hobart foi incrementada para "2" durante vinte segundos para formar uma massa úmida.

20 As misturas de glucosinolato e mirosinase foram então processadas separadamente em um granulador, um multi-granulador de rosca única MG-55 Single-Screw Multi Granulator distribuído pela LCI Corporation (Charlotte, N.C.). As misturas foram introduzidas lentamente em um funil de alimentação e granuladas/extrudadas separadamente a uma
25 velocidade rotacional da rosca de 50 rpm através de uma placa extrusora de 0,8 mm/0,8 *T dome*.

Os extrudados de glucosinolato e mirosinase produzidos no granulador foram então colocados separadamente no equipamento de esferonização, um Marumerizer (modelo QJ-230T distribuído pela LCI

Corporation). Uma vez que o disco de atrito de 2,0 mm atingiu 1500 rpm, os extrudados foram introduzidos separadamente através de um funil de alimentação/tampa e esferonizados durante três minutos ou até criar-se partículas uniformes. Em seguida, as partículas úmidas resultantes foram coletadas. Um Mini-Glatt (distribuído pela Glatt Air Techniques, Inc. (Ramsey, N.J.)), foi ajustado para secagem e aquecido a 40°C. Uma vez aquecidas, as partículas úmidas foram colocadas separadamente na câmara e fluidizadas durante aproximadamente cinquenta e cinco minutos até secarem. As partículas de glucosinolato e mirosinase foram então armazenadas em recipientes opacos separados a 4°C.

B) Revestimento de partículas com shellac.

O Mini-Glatt foi iniciado a uma temperatura de partida determinada para cada amostra. As partículas foram colocadas na câmara e deixadas fluidizar. Um material de revestimento de MARCOAT®125, uma solução de shellac em um sistema de solvente de etanol/água produzido pela Emerson Resources, Inc. (Norristown, PA), foi misturada e então medida dando um revestimento a 30 por cento de sólidos em peso. O material de revestimento foi então fornecido no Mini-Glatt e sobre as partículas fluidizadas usando-se uma bomba Flocon 1003 fabricada pela Roto-Consulta (Lucerne, Suíça). Os ajustes do Mini-Glatt para revestimento das partículas de mirosinase e partículas de glucosinolato foram como detalhado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1

Ajustes Mini-Glatt	Partículas de Mirosinase	Partículas de Glucosinolato
pressão de ar de entrada	0,7 bar a 24°C	0,7 bar a 40°C
pressão de ar de spray	1,0 bar	1,0 bar
taxa de bombeamento	0,6 ml/min (ajuste 5)	0,48 ml/min (ajuste 4)

As soluções de revestimento foram aplicadas lentamente nas

partículas até que se obtivesse um revestimento de 30 por cento. As partículas revestidas foram fluidizadas adicionalmente após revestimento para assegurar um produto acabado seco. As partículas revestidas foram então armazenadas em recipientes opacos a 4°C.

5 C) Incubação de partículas revestidas entericamente em fluidos gastrintestinais simulados

A extensão de dissolução no trato gastrintestinal foi estimada usando-se fluidos biológicos simulados. Soluções de teste de suco gástrico simulado (pH 1,2) e fluido intestinal simulado (pH 6,8) foram preparadas de acordo com USP edição 29, p. 3171, que é incorporada aqui por referência. Para simular digestão gástrica e intestinal, 50 mg de encapsulado produzido na Parte B deste exemplo foram pesados em tubos de centrífuga de polipropileno de 15 ml. Em seguida, adicionou-se 10 ml de solução simulada de fluido gástrico ou intestinal aquecida a 37°C e os tubos foram tampados. Os tubos foram girados de ponta-cabeça a 20 rpm e a 37°C durante uma hora e, depois, secados através de um filtro de microfibra de vidro (VWR grau 691 (West Chester, PA)) para remover o material não dissolvido.

O filtrado foi recolhido. Para encapsulados contendo mirosinase, a atividade de mirosinase de filtrados foi analisada por meio de ensaio espectrofotométrico direto (Palmieri *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 123: 320-324 (1982), que é incorporado aqui por referência). Para encapsulados contendo glucosinolato, análise dos filtrados foi realizada por meio de HPLC como descrito em West *et al.*, *J. Chromatography A*, 966: 227232 (2002), que é incorporado aqui por referência.

25 Examinou-se bateladas em duplicata de partículas de mirosinase revestidas com shellac e partículas de mirosinase não revestidas (i.e., controles). Não se detectou atividade para a mirosinase não revestida após uma hora de incubação em suco gástrico simulado. No entanto, mirosinase revestida com shellac conservou de 56 a 85 por cento de sua

atividade inicial nas mesmas condições. Em ambos os experimentos, mirosinase revestida com shellac dissolvida para liberar 95-103 por cento da atividade inicial após uma hora de incubação em fluido intestinal simulado.

5 Partículas de glucosinolato não revestidas dissolveram-se completamente e rapidamente em fluidos gástrico e intestinal simulados, enquanto que partículas de glucosinolato revestidas com shellac ainda conservaram de 50 a 59 por cento dos glucosinolatos após imersão durante uma hora em fluido gástrico simulado à temperatura do corpo. É importante conservar que as partículas de glucosinolato revestidas com shellac liberaram
10 100 por cento dos glucosinolatos em fluido intestinal simulado.

Exemplo 2: Cápsulas revestidas entericamente contendo mirosinase e glucosinolatos não revestidos

Cápsulas de gelatina da Wonder Laboratories (White House, TN) foram revestidas com revestimentos EUDRAGIT® da Degussa ou
15 Ftalato de Acetato de Celulose ("CAP") da Eastman Chemical Co. (Kingston, T.N.) usando-se um ProCoater da Torpac (Fairfield, N.J.). Revestimentos EUDRAGIT® e CAP são resistentes a ácido estomacal.

De uma maneira geral, os revestimentos são aplicados de forma a proporcionar um revestimento de cerca de 8 a cerca de 12 por cento.
20 Glucosinolatos e beta-tioglicosidases se mostraram estáveis, como medido por meio de HPLC, durante o processo de revestimento. As cápsulas revestidas foram testadas de acordo com o método Torpac (Fairfield, NJ) e permaneceram estáveis em HCl 0,1 N durante um período superior a 2 horas a 37°C, mas dissolveram-se finalmente em tamponador de fosfato pH 6,8 em 30
25 minutos a 37°C.

Embora a invenção tenha sido descrita em termos de concretizações preferidas, aqueles versados na arte reconhecerão que a invenção pode ser praticada com modificação compreendida no espírito e escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de converter glucosinolato a isotiocianato no intestino delgado, caracterizado pelo fato de que compreende administrar oralmente a um sujeito uma composição precursora quimioprotetora revestida entericamente, em que referido método compreende:

(1) partículas de beta-tioglicosidase revestidas entericamente;

(2) partículas de glucosinolato revestidas entericamente,

em que beta-tioglicosidase e glucosinolato são liberados das partículas de beta-tioglicosidase revestidas entericamente e partículas de glucosinolato revestidas entericamente, respectivamente, no intestino delgado onde a beta-tioglicosidase converte glucosinolato a isotiocianato.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a beta-tioglicosidase é mirosinase, o glucosinolato é glucorafanina, e o isotiocianato é sulforafano.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição precursora quimioprotetora revestida entericamente compreende ativador de enzima do grupo que consiste de ácido ascórbico e seus derivados, ou uma combinação dos mesmos.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas de beta-tioglicosidase e partículas de glucosinolato são formadas por meio de esferonização.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição precursora quimioprotetora revestida entericamente compreende adicionalmente um excipiente de revestimento selecionado do grupo que consiste de celulose microcristalina e seus derivados, fibra de aveia, lactose, carbóxi metil celulose, ou uma combinação dos mesmos.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição precursora quimioprotetora revestida entericamente compreende adicionalmente um diluente selecionado do grupo que consiste

de lactose, amido, dextrina, água, glicerol, sorbitol, propileno glicol, ou uma combinação dos mesmos.

5 7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o revestimento entérico é selecionado do grupo que consiste de shellac, alginato de cálcio, zeína, ácidos graxos, gorduras, ou uma combinação dos mesmos.

10 8. Método de converter glucosinato a isotiocianato no intestino delgado, caracterizado pelo fato de que compreende administrar oralmente a um sujeito uma cápsula revestida entericamente contendo uma composição precursora quimioprotetora compreendendo:

(1) partículas de beta-tioglicosidase;

(2) partículas de glucosinato,

15 em que beta-tioglicosidase e glucosinato são liberadas das partículas de beta-tioglicosidase e partículas de glucosinato, respectivamente, no intestino delgado onde a beta-tioglicosidase converte glucosinato a isotiocianato.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a beta-tioglicosidase é mirosinase, o glucosinato é glucorafanina, e o isotiocianato é sulforafano.

20 10. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a composição precursora quimioprotetora compreende adicionalmente um ativador de enzima do grupo que consiste de ácido ascórbico e seus derivados, ou uma combinação dos mesmos.

25 11. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as partículas de beta-tioglicosidase e glucosinato são formadas por meio de esferonização.

12. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a composição precursora quimioprotetora compreende adicionalmente um excipiente de revestimento selecionado do grupo que

consiste de celulose microcristalina e seus derivados, fibra de aveia, carbóxi metil celulose, lactose, ou uma combinação dos mesmos.

13. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a composição precursora quimioprotetora compreende
5 adicionalmente um diluente selecionado do grupo que consiste de lactose, amido, dextrina, água, glicerol, sorbitol, propileno glicol, ou uma combinação dos mesmos.

14. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o revestimento entérico é selecionado do grupo que consiste
10 de shellac, alginato de cálcio, zeína, ácidos graxos, gorduras, ou uma combinação dos mesmos.

15. Composição precursora quimioprotetora revestida entericamente, caracterizada pelo fato de que compreende:

(1) cerca de 0,5 a cerca de 50 por cento em peso de
15 glucosinolato;

(2) cerca de 0,5 a cerca de 50 por cento em peso de beta-tioglicosidase; e

(3) cerca de 1 a cerca de 99 por cento em peso composição compreendendo excipiente de revestimento e opcionalmente diluente,
20 em que a composição precursora quimioprotetora é encapsulada com revestimento entérico.

16. Composição precursora quimioprotetora revestida entericamente de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que as partículas de beta-tioglicosidase são partículas de mirosinase e as
25 partículas de glucosinolato são partículas de glucorafanina.

17. Composição precursora quimioprotetora revestida entericamente de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que compreende de cerca de 0,001 a cerca de 10 por cento em peso de ativador de enzima selecionado do grupo que consiste de ácido ascórbico e

seus derivados, ou uma combinação dos mesmos.

18. Composição precursora quimioprotetora de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o excipiente de revestimento é selecionado do grupo que consiste de celulose microcristalina e seus derivados, fibra de aveia, carbóxi metil celulose, ou uma combinação dos mesmos.

19. Composição precursora quimioprotetora revestida entericamente de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o diluente é selecionado do grupo que consiste de lactose, amido, dextrina, água, glicerol, sorbitol, propileno glicol, ou uma combinação dos mesmos.

20. Composição precursora quimioprotetora revestida entericamente de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o revestimento entérico é selecionado do grupo que consiste de shellac, alginato de cálcio, zeína, ácidos graxos, gorduras, ou uma combinação dos mesmos.

21. Produto alimentício, caracterizado pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz da composição precursora quimioprotetora revestida entericamente como definida na reivindicação 15.

22. Produto alimentício de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o glucosinolato é glucorafanina e a beta-tiogluco-sinolato é mirosinase.

23. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz da composição precursora quimioprotetora revestida entericamente como definida na reivindicação 15.

24. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que o glucosinolato é glucorafanina e o beta-tiogluco-sinolato é mirosinase.

25. Cápsula revestida entericamente, caracterizada pelo fato de

que compreende uma mistura precursora quimioprotetora, em que a mistura quimioprotetora compreende partículas de beta-tioglicosidase não revestidas e partículas de glucosinolato não revestidas numa relação de cerca de 1:100 a cerca de 100:1, em que a mistura está contida em uma cápsula revestida entericamente.

26. Cápsula revestida entericamente de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a beta-tioglicosidase é mirosinase e o glucosinolato é glucorafanina.

27. Cápsula revestida entericamente de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a mistura precursora quimioprotetora compreende adicionalmente cerca de 0,001 a cerca de 10 por cento em peso de ativador de enzima selecionado do grupo que consiste de ácido ascórbico e seus derivados, ou uma combinação dos mesmos.

28. Cápsula revestida entericamente de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a mistura quimioprotetora compreende partículas de beta-tioglicosidase não revestidas e partículas de glucosinolato não revestidas, numa relação de cerca de 1:10 a cerca de 10:1.

29. Cápsula revestida entericamente de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que o revestimento entérico é selecionado do grupo que consiste de shellac, zeína, ácidos graxos, gorduras, ou uma combinação dos mesmos.

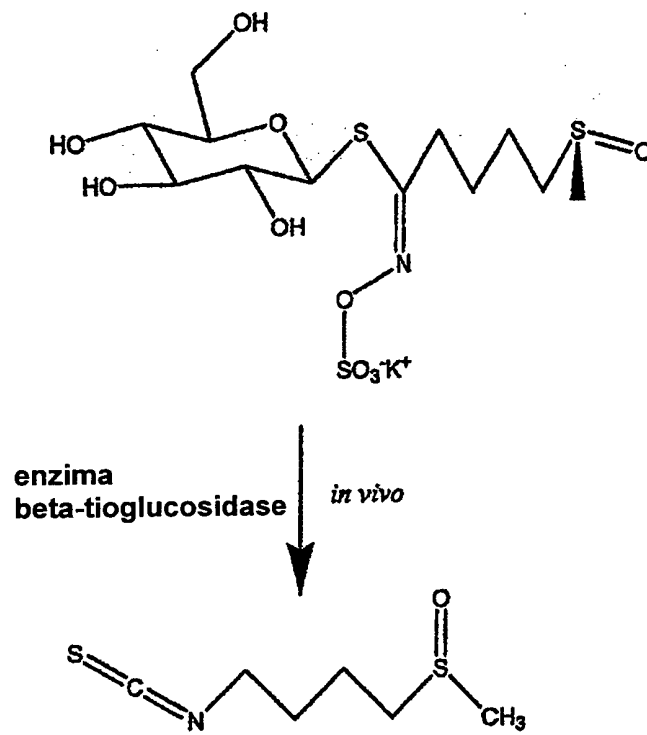


Figura 1

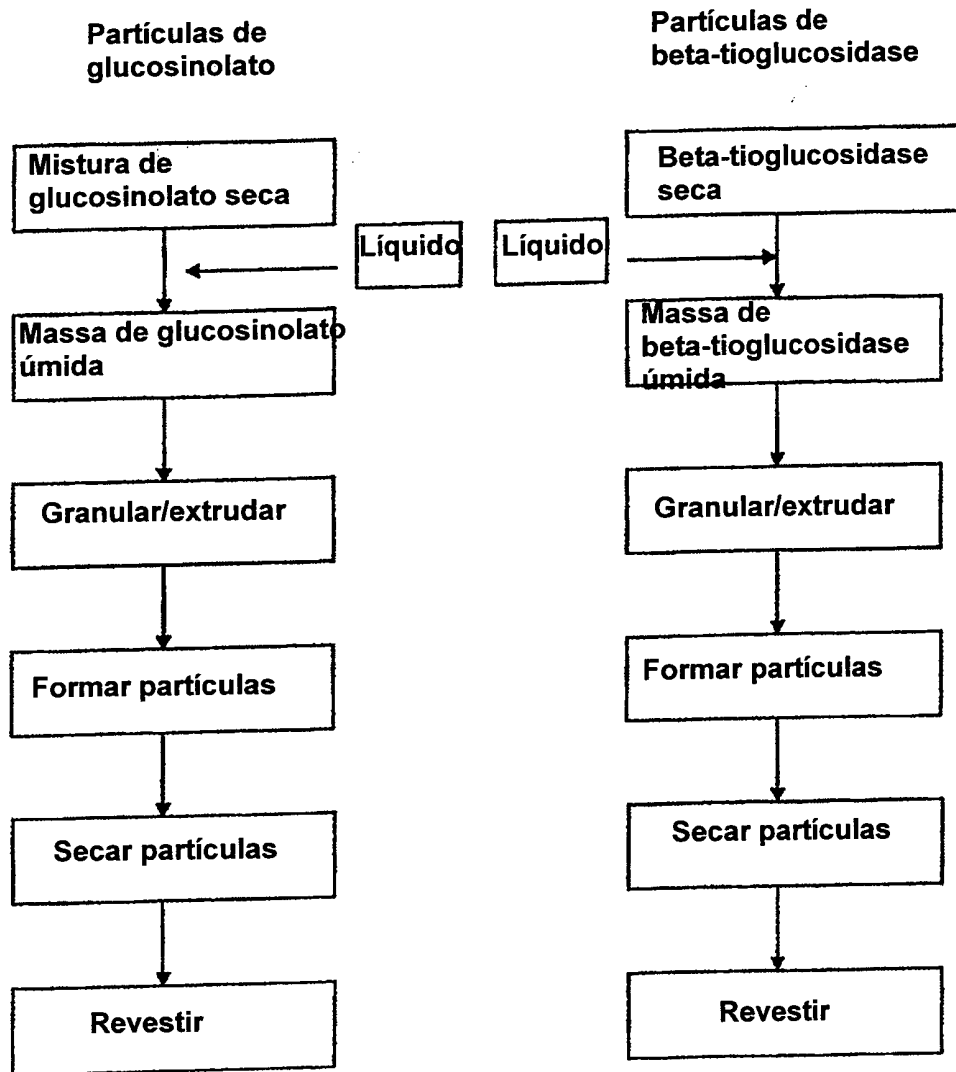


Figura 2

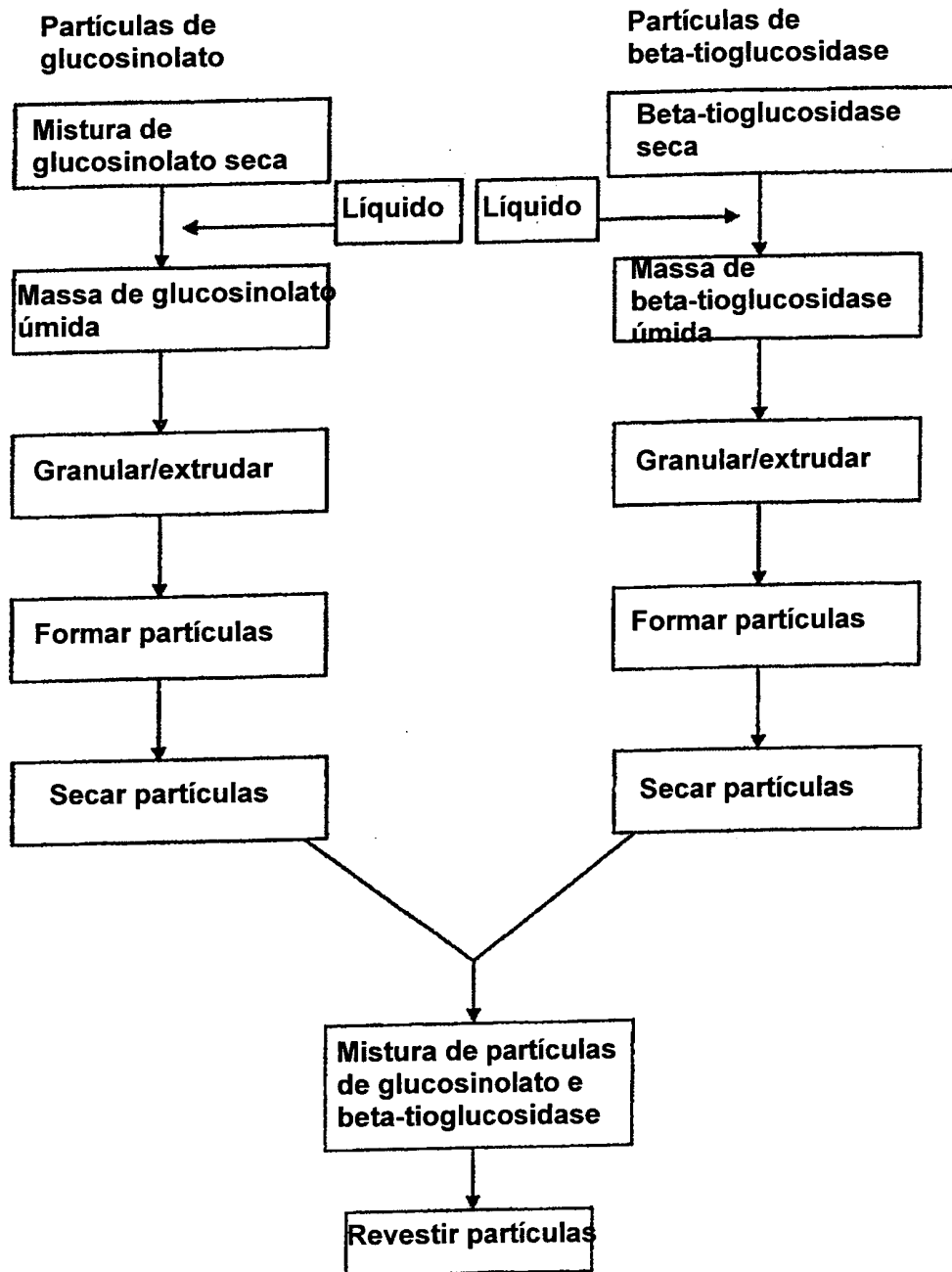


Figura 3

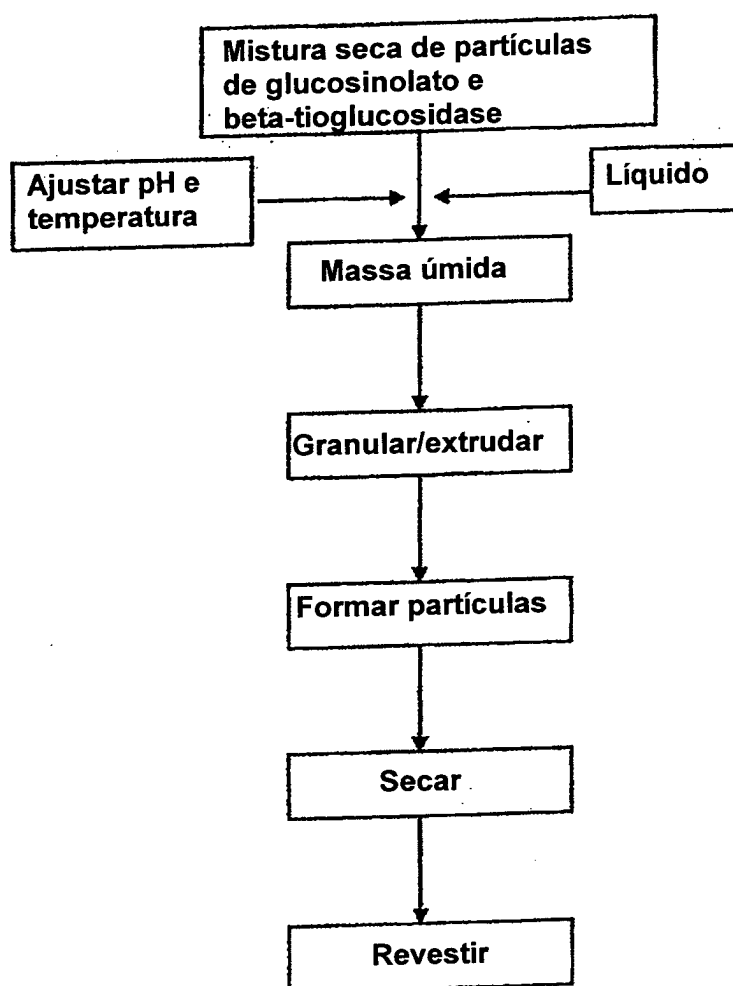


Figura 4

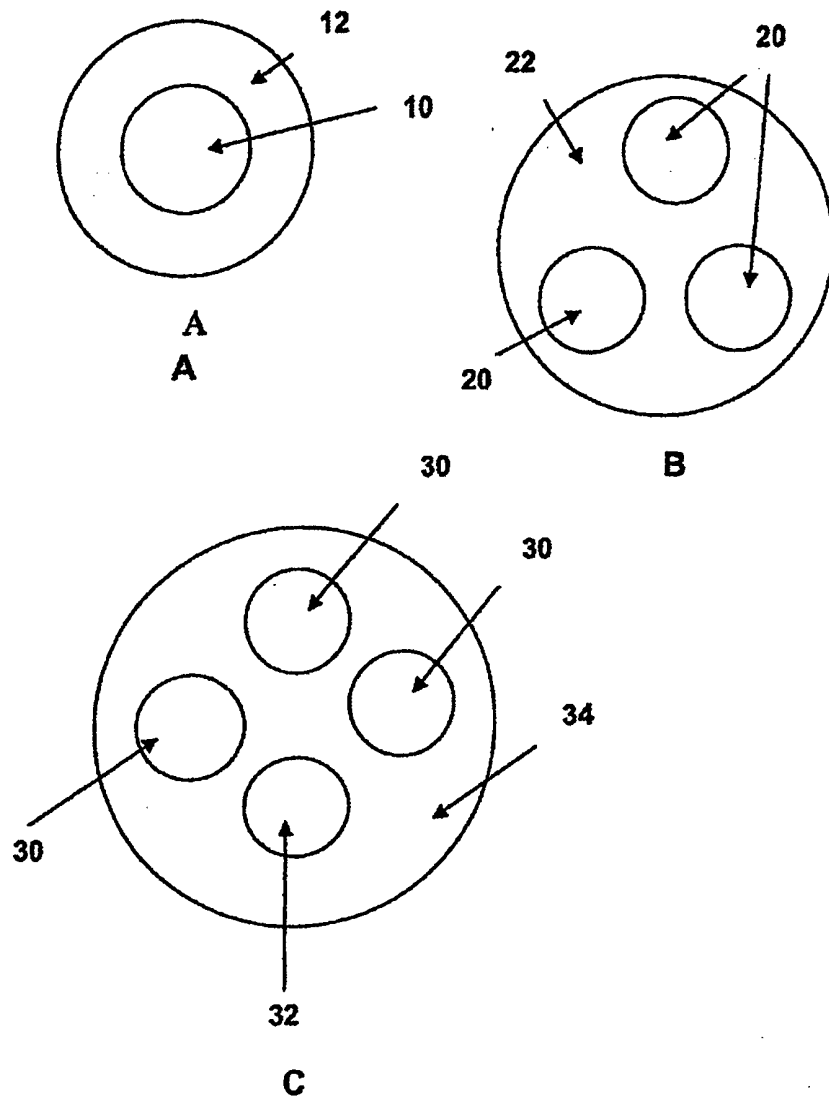


Figura 5

RESUMO

“MÉTODO DE CONVERTER GLUCOSINOLATO A ISOTIOCIANATO
NO INTESTINO DELGADO, COMPOSIÇÃO PRECURSORA
QUIMIOPROTETORA REVESTIDA ENTERICAMENTE, PRODUTO
5 ALIMENTÍCIO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, CÁPSULA
REVESTIDA ENTERICAMENTE”

A presente invenção refere-se a uma composição particulada
compreendendo partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas
entericamente. A presente invenção proporciona adicionalmente um método
10 de converter glucosinolato a isotiocianato no intestino delgado,
compreendendo administrar oralmente a um sujeito uma composição
precursora quimioprotetora revestida entericamente compreendendo
partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato revestidas entericamente. Em
outro aspecto, partículas de beta-tioglicosidase e glucosinolato não revestidas
15 podem ser fornecidas em uma cápsula revestida entericamente. De
preferência, o glucosinolato é glucorafanina e a beta-tioglicosidase é
mirosinase. O revestimento entérico objetiva liberar o composto no intestino
delgado onde enzima beta-tioglicosidase converte glucosinolato a
isotiocianato quimioprotetor.