



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112015000041-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 05/07/2013**

**(45) Data de Concessão: 03/11/2020**

**(54) Título:** MICROPARTÍCULA, MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DA MESMA, COMPOSIÇÃO, PRODUTO ALIMENTAR, FARMACÊUTICO, COSMECÊUTICO OU NUTRACÊUTICO E USO DE UMA MICROPARTÍCULA, COMPOSIÇÃO OU PRODUTO

**(51) Int.Cl.:** A23P 10/30; A23L 33/135; A61K 9/50; A61K 35/74; A61K 8/11; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 05/07/2012 ES P201231058.

**(73) Titular(es):** CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA, LABORATORIO DEL EBRO; UNIVERSIDAD DE NAVARRA.

**(72) Inventor(es):** MAITE AGÜEROS BAZO; IRENE ESPARZA CATALÁN; CARLOS GAMAZO DE LA RASILLA; CAROLINA GONZÁLEZ FERRERO; CARLOS JAVIER GONZÁLEZ NAVARRO; JUAN MANUEL IRACHE GARRETA; REBECA PEÑALBA SOBRÓN; ANA ROMO HUALDE; RAQUEL VIRTO RESANO.

**(86) Pedido PCT:** PCT ES2013070477 de 05/07/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2014/006261 de 09/01/2014

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 02/01/2015

**(57) Resumo:** MICROPARTÍCULA, MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DEFINIDAS, COMPOSIÇÃO, PRODUTO ALIMENTAR, FARMACÊUTICO, COSMECÊUTICO OU NUTRACÊUTICO E USO DE UMA MICROPARTÍCULA A invenção diz respeito a micropartículas compreendendo uma matriz formada por caseína e quitosano e bactérias probióticas; dita matriz protege ditas bactérias probióticas durante (i) processamento, (ii) armazenamento e (iii) trânsito através do trato gastrointestinal, prolongando a sua vida útil. A invenção também diz respeito ao método para a obtenção das micropartículas e aos produtos e composições incorporando estas mesmas.

**MICROPARTÍCULA, MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DA MESMA,  
COMPOSIÇÃO, PRODUTO ALIMENTAR, FARMACÊUTICO,  
COSMECÊUTICO OU NUTRACÊUTICO E USO DE UMA  
MICROPARTÍCULA, COMPOSIÇÃO OU PRODUTO**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[0001] A presente invenção é compreendida no escopo de tecnologia alimentar, nutracêutica, cosmecêutica e farmacêutica. Particularmente, ela diz respeito a micropartículas compreendendo uma matriz formada por caseína e quitosano e bactérias probióticas, a um método para a obtenção das micropartículas e a suas aplicações.

**FUNDAMENTO DA INVENÇÃO**

**Generalidades**

[0002] A microbiota intestinal de um adulto saudável é relativamente estável e contém várias populações bacterianas benéficas compostas principalmente de espécies de lactobacilos e bifidobactérias que possuem um papel importante na saúde do hospedeiro. Desequilíbrio da microbiota colônica benéfica pode contribuir para o desenvolvimento de diferentes distúrbios, tais como infecções do trato gastrointestinal, constipação, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal, alergias, doenças cardíacas e câncer de cólon. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou a utilização do potencial terapêutico e profilático de microrganismos benéficos ou probióticos para prevenir esses riscos.

[0003] Os probióticos são definidos como microrganismos vivos os quais proveem efeitos fisiológicos benéficos para o hospedeiro quando administrados em quantidades suficientes (Pérez-Luyo, 2008). Neste sentido, é atribuído a eles: ajuda na digestão da lactose, prevenção de infecção intestinal, ação imunomoduladora, prevenção da doença cardiovascular e de câncer. Adicionalmente, o possível papel dos probióticos na prevenção da cárie dental está sob investigação.



[0004] Há quatro maneiras básicas para o consumo de probióticos: como uma cultura concentrada adicionada a uma bebida (por exemplo, suco de frutas, etc.), inoculados em fibras prebióticas, como um suplemento dietético, em formas de dosagem de célula liofilizada (por exemplo, pó, capsulas, comprimidos, etc.) e inoculados em alimentos à base de leite.

[0005] As bactérias probióticas foram incorporadas em uma ampla gama de alimentos, principalmente em produtos lácteos (iogurte, queijo, sorvetes, sobremesas à base de leite, etc.), mas também em outros alimentos, como cereais, sucos, chocolate, etc.

[0006] No entanto, a taxa de sobrevivência dos probióticos nestes produtos durante o processamento e/ou preservação é muito baixa (De Vos *et al.*, 2010), e para estes microrganismos produzirem os efeitos benéficos mencionados, eles devem permanecer viáveis e devem estar na concentração adequada na hora de consumo. Há vários fatores que são responsáveis pela redução da viabilidade da cultura de probiótico, tais como, por exemplo, acidez no final do processamento/produção de alimentos, acidez produzida durante a vida útil dos mesmos ou pós-acidificação, inibição por metabólitos de fermentação, falta de nutrientes, permeabilidade da embalagem, pressão osmótica, temperatura de armazenamento, interação com outras espécies microbianas, etc. Geralmente, quanto mais ácido o produto ao longo do seu tempo de vida, menor a viabilidade das bactérias probióticas tais como *Bifidobacteria* e *L. acidophilus*.

[0007] As estratégias para melhorar a viabilidade probiótica incluem selecionar cepas resistentes aos ácidos, aumentar a concentração inicial de microrganismos probióticos, ou adicionar um prebiótico adequado o qual mantém um metabolismo ativo durante toda a vida do mesmo, um baixo nível de pós-acidificação, e impedindo a formação de metabólitos de fermentação indesejáveis. Levando em conta que os concentrados

probióticos são frequentemente armazenados por longos períodos de tempo antes da sua utilização e após incorporação em produtos alimentares e/ou nutracêuticos, é de grande importância encontrar um sistema que permita manter a viabilidade bacteriana ao longo de todo este tempo e, assim, prolongar a vida útil do produto, se possível, sem a necessidade de usar condições específicas de temperatura e umidade a fim de evitar custos econômicos adicionais.

[0008] Um aspecto relevante a ser considerado quando se usa probióticos é que para que produzam os efeitos benéficos mencionados para a saúde humana, devem atingir o cólon de maneira ainda viável, através do qual eles necessitam superar a barreira do trato gastrointestinal superior, isto é, a acidez e enzimas digestivas no estômago e os sais biliares no intestino delgado.

[0009] Além disso, bactérias probióticas são expostas a vários fatores de estresse durante a produção a nível industrial, tais como a congelamento, a secagem, a exposição ao oxigênio, temperaturas, altas concentrações de ácido lático no meio de cultura, etc.

[00010] Em vista do que precede, a possibilidade de encapsulação de probióticos vivos, como uma alternativa para a manutenção da sua viabilidade dadas as condições ambientais adversas descritas (Borgogna *et al.*, 2010; Ding e Shah, 2008) está ganhando um grande interesse hoje. Estas técnicas têm sido utilizadas durante vários anos, no entanto os benefícios obtidos através das mesmas podem ainda ser melhorados.

[00011] A maioria das metodologias de microencapsulação probióticas projetadas até agora estão compreendidas em três grandes grupos: extrusão, emulsão e secagem por pulverização escaláveis a nível industrial (Heidebach *et al.*, 2011). O método de extrusão é um método simples e econômico que não prejudica as bactérias, embora não seja uma técnica facilmente escalável, o que torna a obtenção de grandes



quantidades de produto difícil. Apesar de a emulsificação ser a técnica de encapsulamento de bactérias probióticas mais comumente descrita na literatura, é uma técnica mais complexa que requer a utilização de surfactantes e óleos, sendo assim mais economicamente inviável, ela pode afetar as propriedades organolépticas e textura do produto em que estão incorporadas e não é adequada para o desenvolvimento de produtos alimentares de baixa gordura. A microencapsulação por meio de secagem por pulverização (“*spraying*” ou “pulverização”) é um processo simples e econômico, embora ele dê origem a uma elevada taxa de mortalidade de bactérias como resultado dos simultâneos desidratação e processo de inativação térmica dos microrganismos.

[00012] Geralmente, as microcápsulas mais adequadas para encapsular os probióticos devem cumprir os seguintes requisitos (Heidebach *et al.*, 2011):

[00013] serem obtidas por meio de um processo simples e econômico que não comprometa a viabilidade bacteriana.

[00014] ter um tamanho e características que são adequados para impedir alteração das propriedades organolépticas dos alimentos nas quais estão incorporadas (partículas com tamanhos maiores do que 100 µm podem ser percebidas pelo consumidor).

[00015] proteger os probióticos de condições adversas ambientais (matriz, processamento, armazenamento, etc.).

[00016] estabilizar os probióticos e protegê-los contra o estresse derivado das condições do trato gastrointestinal superior.

[00017] liberar as bactérias vivas no intestino.

[00018] Nenhuma formulação que satisfaça todos os requisitos desejados, ou, pelo menos, os requisitos mais relevantes, foi desenvolvida até agora.

[00019] Um dos materiais utilizados para a encapsulação de bactérias probióticas é a caseína, uma proteína conjugada perfazendo

cerca de 80% das proteínas totais do leite. Estudos têm sido desenvolvidos utilizando esta proteína sozinha ou em combinação com outros polímeros, incluindo polissacarídeos, para encapsular as bactérias probióticas (Heidebach *et al.*, 2009, Heidebach *et al.*, 2010. Oliveira *et al.*, 2007), bons resultados de eficiência de encapsulação sendo obtidos, sem comprometer a viabilidade bacteriana. Dos três trabalhos mencionados, os dois primeiros são baseados em um sistema de emulsão significativamente não escalável que dá origem a microcápsulas de tamanhos muito grandes (maiores que 100  $\mu\text{m}$ ). Por outro lado, estudos sobre a resistência ao pH ácido realizados nos três trabalhos identificados mostram claramente que as microcápsulas protegem as bactérias da acidez. No entanto, nenhum dos ditos trabalhos conduz o estudo utilizando pepsina para reproduzir as condições gástricas reais que são mais agressivas do que mero pH ácido (a enzima pode degradar a proteína e aumentar a exposição bacteriana ao meio). Da mesma forma, nesses trabalhos são conduzidos estudos de viabilidade ao longo do tempo, uma perda muito significativa das contagens bacterianas tanto nas formulações de bactérias encapsuladas e nas formulações de bactérias livres, sendo menor no caso de bactérias encapsuladas, sendo observada a 60-120 dias de armazenamento (sob diferentes condições).

[00020] *Lactobacillus plantarum* é uma das bactérias de ácido láctico mais comumente utilizadas; esta bactéria é considerada como um organismo GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) capaz de colonização saudável do trato gastrointestinal humano. Muitas cepas de *L. plantarum* são comercializadas hoje em dia como probióticos. No entanto, *L. plantarum* é uma bactéria que é muito sensível às condições do meio gastrointestinal, pode ser mantida por um tempo muito curto em armazenamento, mesmo sob refrigeração, já que sua contagem cai de forma muito significativa, em apenas alguns dias (Ayub e Brinques, 2011).

[00021] Dois artigos foram publicados recentemente relativos ao encapsulamento destas bactérias para protegê-las tanto durante o



armazenamento quanto durante a passagem através da barreira gastrointestinal. No primeiro artigo (Ayub e Brinques, 2011), os autores usam diferentes tipos de formulações, todos eles com base em alginato e / ou pectina e / ou quitosano, para a encapsulação de tais bactérias. No entanto, eles não conseguem melhorar a resistência gastrointestinal e embora eles melhorem o número de células viáveis durante o armazenamento a 4°C, há ainda uma redução significativa no número de células viáveis depois de 38 dias de estudo. Em um outro artigo (Gbassi *et al.*, 2009), a resistência das bactérias é aumentada significativamente após imobilização das mesmas em uma matriz de alginato revestida com proteínas do soro de leite. No entanto, isso não diz respeito a micropartículas mas sim a partículas macroscópicas, cujas propriedades organolépticas podem ser bastante indesejáveis e as quais, além disso, requerem liofilização para preservação.

[00022] Uma outra bactéria de ácido láctico mais comumente utilizada é *Lactobacillus casei*, cujo potencial de promoção da saúde tem sido amplamente divulgado. Ela pode ser encontrada em vários produtos distribuídos em todo o mundo incluindo os leites fermentados tradicionais, como Yakult, kefir, Actimel, gelifus e vifit, e em queijos como parmesão e manchego entre outros. Contudo, esta bactéria tem as mesmas limitações que a precedente (*L. plantarum*), isto é, é sensível às condições do trato gastrointestinal superior e a sua estabilidade durante os períodos de armazenagem é muito limitada.

[00023] Adicionalmente, sistemas para encapsular as bactérias probióticas com base na utilização de alginato como um polímero de encapsulação têm sido descritos e em muitos destes casos são obtidas cápsulas de tamanhos muito grandes (entre 700 µm e 2 mm), ou ainda métodos de emulsificação não escaláveis são utilizados. Apesar de a resistência das bactérias ao pH ácido ser aumentada em alguns casos, quando são encapsuladas, a maioria destes trabalhos não conduz os

estudos na presença de enzimas, de modo que os problemas gastrointestinais não são fielmente reproduzidos, apenas a resistência à acidez sendo contemplada. Por outro lado, estes sistemas de encapsulação também reduzem a diminuição na contagem de bactérias durante o armazenamento sob diferentes condições, no entanto, apesar disso, ainda existem reduções significativas ao longo de períodos de tempo curtos.

[00024] Portanto, ainda há uma necessidade de desenvolver sistemas os quais permitem proteger as bactérias probióticas durante processamento, armazenamento e / ou trânsito através do trato gastrointestinal; vantajosamente, ditos sistemas são micropartículas contendo as bactérias probióticas, quais possuem um tamanho uniforme e não interferem com as propriedades organolépticas do produto em que se encontram, eventualmente, incorporadas e são capazes de proteger as bactérias probióticas durante o processamento e armazenamento sob condições controladas ou ambientais, e durante o trânsito através do trato gastrointestinal.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

[00025] Os inventores da presente invenção descobriram micropartículas que resolvem os problemas acima mencionados, isto é, micropartículas possuindo a capacidade de encapsular as bactérias probióticas para incorporação em alimentos e produtos nutracêuticos, cosmeceuticos e produtos farmacêuticos. Estas micropartículas protegem as bactérias probióticas de serem inativadas por agentes externos, tanto durante o processamento do alimento ou do produto nutracêutico, cosmético ou farmacêutico, em que elas são incorporadas, e durante o armazenamento durante períodos prolongados sob condição ambiental ou controlada, aumentando a vida útil destes alimentos ou produtos nutracêuticos. Além disso, depois de serem levadas para dentro, elas facilitam liberação das bactérias probióticas no local desejado, protegendo



as mesmas contra as condições “ácido-pépticas” do trato gastrointestinal superior, particularmente no estômago.

[00026] Estas micropartículas são estáveis e inertes na comida ou na formulação nutracêutica, cosmecêutica ou farmacêutica na qual estão incorporados, impedindo que a matriz alimentar, nutracêutica, farmacêutica ou cosmética comprometa a viabilidade bacteriana.

[00027] Além disso, os inventores desenvolveram um método para a obtenção destas micropartículas de uma forma simples que é aplicável em escala industrial. Este método não inclui o uso de surfactantes ou emulsificantes, polímeros sintéticos, ou qualquer reagente que não é aprovado como aditivo alimentar. Além disso, este método permite controlar o tamanho das micropartículas obtidas para ser inferior a 100 µm para impedir que sejam notadas pelo consumidor ou que afetem negativamente as propriedades organolépticas do produto em que se encontram incorporadas.

[00028] As micropartículas podem ser ressuspensas, mas não dissolvidas, facilmente num meio aquoso, protegendo a bactéria probiótica a qual elas contêm a partir do meio. As micropartículas da invenção permanecem estáveis no produto em que estão incorporadas, de modo que uma diminuição significativa na contagem das bactérias viáveis após longos períodos de armazenamento sob condições ambientais e/ou controladas é impedida. Além disso, estas micropartículas são aplicáveis a diferentes tipos de alimentos, de bebidas e produtos lácteos aos alimentos sólidos, e em produtos nutracêuticos. Da mesma maneira, ditas micropartículas podem ser formuladas em formulações farmacêuticas e cosmecêuticas.

[00029] Adicionalmente, foi verificado que ditas micropartículas têm um forte efeito imunomodulador e favorecem a indução de uma resposta de T-auxiliar 1 (Th1) e/ou desloca a resposta imune em direção a Th1, por conseguinte, elas podem ser utilizadas na fabricação de uma composição de modulação (imunomoduladora) do sistema imunológico

para a prevenção e/ou tratamento de uma deficiência do sistema imunológico, por exemplo, na prevenção e/ou tratamento de Rejeição de transplante mediada por Th2, alergias e doenças associadas à alergia, imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências, infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares e/ou infecções das mucosas.

[00030] As micropartículas da invenção proveem um novo sistema para encapsular e estabilizar microrganismos probióticos. De acordo com a presente invenção, caseína é utilizada em combinação com quitosano como um veículo para proteger as bactérias probióticas das condições ambientais durante longos períodos de armazenamento e das condições gástricas, aumentando assim a sua vida útil e facilitando a liberação no intestino, melhorando assim o seu efeito probiótico. Além disso, a caseína *per se* tem propriedades nutricionais significativas que complementam os efeitos benéficos da própria bactéria probiótica encapsulada.

[00031] Em resumo, as micropartículas da invenção têm a capacidade de proteger as bactérias probióticas durante (i) processamento, (ii) armazenamento e (iii) trânsito através do trato gastrointestinal.

[00032] Portanto, em um aspecto, a invenção diz respeito a micropartículas que compreendem uma matriz e uma bactéria probiótica, em que dita matriz consiste em caseína e quitosano.

[00033] Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a um método para a obtenção das micropartículas providas por esta invenção, o qual compreende misturar uma caseína ou uma fonte de caseína, bactérias probióticas e quitosano.

[00034] Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma composição compreendendo uma pluralidade de micropartículas providas por esta invenção, ou compreendendo pelo menos uma micropartícula



provida por esta invenção e um veículo alimentar, nutracêutico, cosmecêutico ou farmacêutico aceitável.

[00035] Em um outro aspecto, a invenção diz respeito a um produto alimentar, nutracêutico, cosmecêutico ou farmacêutico compreendendo as micropartículas providas por esta invenção.

[00036] Em um outro aspecto, a invenção diz respeito ao uso de dita micropartícula, composição ou produto providos por esta invenção na fabricação de uma composição moduladora do sistema imunológico, ou em outras palavras, a invenção diz respeito a ditos micropartícula, composição ou produto providos por esta invenção para uso em uma composição moduladora do sistema imunológico. Dita composição imunomoduladora favorece a indução de uma resposta Th1 e / ou desloca a resposta imune para Th1, preferencialmente de Th2 em direção a Th1, e pode ser utilizado para a prevenção e / ou tratamento de deficiências do sistema imunológico, por exemplo, na prevenção e/ou tratamento de (i) Rejeição de transplante mediada por Th2, (ii) alergias e doenças associadas à alergia, (iii) imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências, (iv) infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares e/ou infecções das mucosas.

[00037] A invenção também diz respeito a uma micropartícula, composição ou produto providos por esta invenção para serem usados oralmente na prevenção e/ou no tratamento de uma deficiência do sistema imunológico, e a uma micropartícula, composição ou produto providos por esta invenção para serem usados oralmente na prevenção e/ou no tratamento de Rejeição de transplante mediada por Th2; alergias e doenças associadas à alergia; imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências; infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares, ou infecções das mucosas.

[00038] Outros aspectos mais detalhados da presente invenção serão esclarecidos nas seguintes seções, nas quais estão incluídos

exemplos concretos que mostram os resultados mais relevantes, tanto por meio de ilustrações mais aprofundadas quanto por explicação.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00039] Figura 1 mostra as imagens de microscopia óptica de micropartículas de caseína modificadas com quitosano obtidas por meio de secagem por pulverização: A) micropartículas vazias (x 20); B) com *L. plantarum* (x 20) encapsulada. A linha horizontal na parte inferior direita representa 100 µm.

[00040] Figura 2 mostra as imagens de microscopia óptica fluorescentes de: A) *L. plantarum* manchada com o marcador fluorescente (x 20); B) micropartículas de caseína modificadas com quitosano obtidas por meio de secagem por pulverização com *L. plantarum* (x 20) encapsulada (manchada com o marcador fluorescente). A linha horizontal na parte inferior direita representa 100 µm.

[00041] Figura 3 mostra a imagem de microscopia óptica de fluorescência de micropartículas de caseína modificadas com quitosano e na presença de sais de cálcio obtidos por meio de secagem por pulverização com *L. plantarum* (x 20) encapsulada (manchada com o marcador fluorescente). A linha horizontal na parte inferior direita representa 100 µm.

[00042] Figura 4 é um gráfico que mostra a sobrevivência de *L. plantarum* sob condições ambientais (25°C) ao longo do tempo: suspensão fresca de *L. plantarum*; *L. plantarum* liofilizada não encapsulada; *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano (formulação Ap); *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de vanilina (formulação Bp); *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de TPP (formulação Cp); e *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de sais de cálcio (formulação Dp).



[00043] Figura 5 é um gráfico que mostra a sobrevivência de *L. plantarum* em meio gastrointestinal simulado (0 a 2 horas: meio gástrico simulado; 2.1 a 8 horas: meio intestinal simulado): suspensão fresca de *L. plantarum*; *L. plantarum* liofilizada não encapsulada; *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano (formulação Ap); *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de vanilina (formulação Bp); *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de TPP (formulação Cp); e *L. plantarum* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de sais de cálcio (formulação Dp). \* indica diferenças significativas nas contagens de micropartículas no que diz respeito ao produto liofilizado ( $p < 0.05$ ).

[00044] Figura 6 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de vanilina (formulação Bp), durante processo de degradação com *L. plantarum* encapsulada, depois de ter sido submetida a tratamento em meio gastrointestinal simulado.

[00045] Figura 7 é um gráfico que mostra a sobrevivência de *L. casei* sob condições ambientais (25°C) ao longo do tempo: suspensão fresca de *L. casei*; *L. casei* liofilizada não encapsulada; *L. casei* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano (formulação Ac); *L. casei* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de vanilina (formulação Cc); e *L. casei* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de tripolifosfato (TPP) (formulação Dc).

[00046] Figura 8 é um gráfico que mostra a sobrevivência de *L. casei* em meio gastrointestinal simulado (0 a 2 horas: meio gástrico simulado; 2.1 a 8 horas: meio intestinal simulado): *L. casei* liofilizada não encapsulada; *L. casei* encapsulada em micropartículas de caseína

modificadas com quitosano (formulação Ac); *L. casei* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de vanilina (formulação Cc); e *L. casei* encapsulada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de tripolifosfato (TPP) (formulação Dc). \* Indica diferenças significativas nas contagens de micropartículas no que diz respeito ao produto liofilizado ( $p < 0.05$ ).

[00047] Figura 9 é um gráfico de barras que mostra os resultados da análise imunofenotípica de linfócitos periféricos obtidos a partir de camundongos tratados com *L. plantarum* na sua forma não encapsulada (LP livre), *L. plantarum* encapsulada (Bp) ou com a mistura física de bactérias (*L. plantarum*) e partículas (mistura física). A linha pontilhada mostra a razão obtida no grupo de controle *não tratado*.

[00048] Figura 10 é um gráfico de barras que mostra os resultados do índice da razão Th1/Th2 após a estimulação *in vitro* de linfócitos periféricos obtidos a partir de camundongos tratados com *L. plantarum* na sua forma não encapsulada (LP livre), *L. plantarum* encapsulada (Bp) ou com a mistura física de bactérias e partículas (mistura física).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00049] A presente invenção diz respeito à produção de micropartículas para encapsular as bactérias probióticas, com a finalidade de prevenir a sua inativação após incorporação em matrizes alimentares, nutracêuticas, farmacêuticas ou cosmecêuticas ou protegê-los durante o processamento e armazenamento ao longo de períodos prolongados de armazenamento em condições controladas ou ambientais e, protegendo-os adicionalmente das condições “ácido-pépticas” durante o trânsito através do trato gastrointestinal, uma vez levadas para dentro.

#### Micropartículas da invenção

[00050] Portanto, em um aspecto, a invenção diz respeito a micropartículas, doravante “micropartículas da invenção”, compreendendo



uma matriz e uma bactéria probiótica, em que dita matriz consiste em caseína e quitosano.

[00051] Como usado neste documento, o termo “micropartículas” é utilizado para designar os sistemas coloidais de tipos de esfera ou formas semelhantes que tenham um tamanho menor que 1 milímetro (mm), geralmente na ordem de 0.5 a 999 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), tipicamente na ordem de 1 a 900  $\mu\text{m}$ . Em uma modalidade particular, as micropartículas da invenção têm um tamanho menor que 1 mm, geralmente compreendido entre 0.1 e 999  $\mu\text{m}$ , tipicamente entre 0.2 e 900  $\mu\text{m}$ , vantajosamente entre 0.3 e 500  $\mu\text{m}$ , preferencialmente entre 0.4 e 250  $\mu\text{m}$ , mais preferencialmente entre 0.5 e 125  $\mu\text{m}$ , ainda mais preferencialmente entre 0.7 e 50  $\mu\text{m}$ , ainda mais preferencialmente entre 1 e 40  $\mu\text{m}$ , mesmo ainda mais preferencialmente entre 2 e 12  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

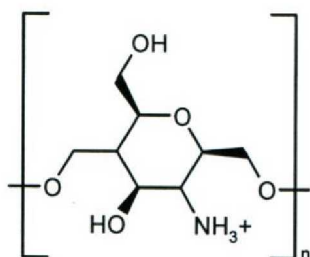
[00052] No escopo da presente invenção, o termo “matriz” diz respeito a agente/agentes ou composição de revestimento. De acordo com a presente invenção, dita matriz consiste em caseína e quitosano e reveste as bactérias probióticas completamente ou parcialmente

[00053] O termo “probiótico” é definido como um microrganismo vivo o qual exerce uma ação fisiológica benéfica na saúde do hospedeiro, quando administrado em quantidades adequadas (FAO/WHO 2002. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*, London). Os probióticos usados na presente invenção são “bactérias probióticas”, isto é, bactérias vivas as quais exercem uma ação fisiológica benéfica à saúde do hospedeiro, quando administradas em quantidades adequadas. Em uma modalidade particular, dita bactéria probiótica é uma bactéria do gênero *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus*. Em uma modalidade mais particular, dita bactéria probiótica é selecionada a partir de *L. plantarum* e *L. casei*. Em uma modalidade específica, as bactérias probióticas são *L. plantarum* CECT 220 e *L. casei* CECT 475 T isoladas a partir de silagem de milho e queijo, respectivamente. Em uma outra modalidade particular, dita bactéria

probiótica é uma cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, tal como a que é comercializada sob a marca registada BB-12®.

[00054] Como usado neste documento, o termo “caseína” diz respeito a uma proteína conjugada perfazendo cerca de 80% de proteínas totais do leite. É uma proteína de tipo fosfoproteína que cai na definição de globulinas, é solúvel; tem uma capacidade de retenção de água e precipita a um pH de cerca de 4.6 a 20°C. É formada por quatro frações essenciais ( $\alpha$ s1-caseína,  $\alpha$ s2-caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína) que são diferentes umas das outras, devido à sua composição de aminoácidos, a sua distribuição de carga e a sua tendência para formar agregados na presença de cálcio. No leite, caseínas formam micelas coloidais estáveis de entre 50 entre 600 nm em diâmetro (cerca de 150 nm em média). “Quitosano” é um polímero natural derivado a partir da N-desacetilação da quitina (poli-N-acetil-D-glucosamina). O processo de desacetilação envolve a remoção de grupos acetil a partir da cadeia molecular de quitina, deixando para trás um grupo amino completo ( $-\text{NH}_2$ ). O grau de desacetilação de uma amostra de quitosano, portanto, diz respeito ao conteúdo de grupos amino livres nas subunidades do polissacarídeo e pode ser determinado, por exemplo, de acordo com o método descrito por Hidalgo *et al.* ou o padrão ASTM F2260-03(2008) (Método de Teste Padrão para Determinação de Grau de Desacetilação em Sais de Quitosano por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons - *Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) entre outros. Geralmente, o grau de desacetilação do quitosano comercial é igual a ou maior do que 40%, preferencialmente igual a ou maior do que 60%. Em uma modalidade particular, o grau de desacetilação do quitosano é compreendido entre 60% e 100%, normalmente entre 75% e 95%, ou mais. O quitosano tem uma estrutura de aminopolissacarídeo baseada na repetição de unidades de monômero de fórmula (I):





(I)

[00055] onde “n” é um número inteiro, e além disso, um número “m” de unidades onde o grupo amino é acetilado. A soma de “n+m” representa o grau de polimerização, isto é, o número de unidades de monômero na cadeia de quitosano.

[00056] O quitosano é protonado, principalmente, a pH ácido, portanto, é um polissacarídeo carregado positivamente a pH ácido.

[00057] O peso molecular do quitosano pode variar dentro de uma vasta gama; no entanto, em uma modalidade particular, o peso molecular do quitosano usado para obter as micropartículas da invenção é compreendido entre 5 e 850 kDa, normalmente entre 25 e 300, preferencialmente entre 40 e 200 kDa, mais preferencialmente entre 50 e 150 kDa.

[00058] No escopo da presente invenção entende-se que como uma alternativa ao quitosano um seu derivado pode ser usado, tal derivado sendo entendido como um quitosano no qual um ou mais grupos hidroxil e / ou um ou mais grupos amino foram modificados. Estes derivados incluem, entre outros, quitosanos acetilados, alquilados ou sulfonatados, bem como derivados tiolados, tais como descritos por *Roberts, Chitin Chemistry, Macmillan, 1992, 166*. Quando um derivado é utilizado, ele é preferencialmente selecionado a partir dos éteres O-alquílicos de quitosano, ésteres de O-acil de quitosano, trimetilquitosano, quitosanos modificados com polietileno glicol, etc. Outros derivados possíveis incluem sais, tais como citrato de quitosano, nitrato de quitosano, lactato de quitosano, fosfato de quitosano, glutamato de quitosano, etc.. Em qualquer caso, a

pessoa versada na técnica pode identificar as modificações que podem ser feitas no quitosano sem afetar a estabilidade e viabilidade comercial da formulação final. Em uma modalidade particular, o derivado de quitosano é um quitosano modificado hidrofílicamente; como usado neste documento, um “quitosano modificado hidrofílicamente” é um quitosano modificado com um grupo hidrófilo, tal como um grupo o qual aumenta a solubilidade do quitosano em meio aquoso, por exemplo, um quitosano alquilado (por exemplo, trimetilquitosano, etc.), um quitosano sulfonado, um quitosano tiolado, um sal de quitosano (por exemplo, glutamato, cloreto, lactato, acetato, etc.), um quito-oligossacarídeo, etc. Em uma outra modalidade particular, o derivado de quitosano não é um quitosano modificado hidrofobicamente; como usado neste documento, um “quitosano modificado hidrofobicamente” é um quitosano modificado com um grupo hidrofóbico, isto é, com um grupo que reduz a solubilidade de quitosano em um meio aquoso, por exemplo, um grupo alquil ou aril com um tamanho suficiente de modo a conferir hidrofobicidade aumentada ao quitosano, por exemplo, ácidos graxos ou resíduos de aldeído, preferencialmente ácidos graxos saturados ou insaturados de 3 a 18 átomos de carbono, tal como por exemplo, ácido palmítico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico, ácido capríco, ácido caprílico, ácido esteárico, ácido propanóico ou ácido butírico. Em uma outra modalidade particular, quando a matriz da micropartícula da invenção consiste em caseína e um derivado de quitosano, tal como um quitosano modificado hidrofobicamente, a micropartícula da invenção carece de um revestimento exterior que consiste em alginato ou alginato hidrofobicamente modificado (alginato modificado com um grupo hidrofóbico, tal como definido anteriormente com respeito ao quitosano modificado hidrofobicamente).

[00059] Como mencionado acima, o quitosano e caseína compõem a matriz a qual faz parte das micropartículas da invenção. A razão em peso de quitosano : caseína pode variar dentro de uma vasta



gama; no entanto, em uma modalidade particular, dita razão em peso de quitosano : caseína é 1:1-150, preferencialmente 1:5-100, mais preferencialmente cerca de 1:14-40.

[00060] A quantidade de bactérias probióticas por unidade de peso da matriz que pode apresentar nas micropartículas da invenção pode variar dentro de uma vasta gama; no entanto, em uma modalidade particular, as micropartículas da invenção compreendem pelo menos  $10^6$  unidades formadoras de colônia por miligrama (CFU/mg) de matriz, geralmente entre  $10^6$  CFU/mg e  $5 \times 10^{13}$  CFU/mg, preferencialmente entre  $10^8$  CFU/mg e  $10^{12}$  CFU/mg.

[00061] Em uma modalidade particular, as micropartículas da invenção adicionalmente compreendem um agente de reticulação. Exemplos não limitativos ilustrativos dos ditos agentes de reticulação incluem cátions de metal divalentes que são farmacologicamente ou cosmeticamente aceitáveis, ou são adequados para utilização na alimentação humana ou animal; tripolifosfatos; e, geralmente, qualquer substância capaz de estabelecer uma interação química com caseína e / ou quitosano.

[00062] Como usado neste documento, um “cátion de metal divalente o qual é farmacologicamente ou cosmeticamente aceitável, ou é adequado para utilização na alimentação humana ou animal”, é um cátion proveniente de qualquer elemento de metal cuja valência é 2, tal como um metal alcalino-terroso, por exemplo, cálcio, magnésio, zinco, etc, ou, se ele tem várias valências, uma delas é 2, por exemplo, ferro, etc., com a ressalva de que seja farmacologicamente ou cosmeticamente aceitável, ou é adequado para utilização em alimentos; em uma modalidade particular, dito cátion de metal divalente é selecionado a partir do grupo que consiste em  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e combinações dos mesmos. Como será compreendido por uma pessoa versada na técnica, o cátion de metal divalente útil como agente de reticulação pode ser provido por uma fonte

adequada do dito cátion de metal, tal como um composto o qual dá origem a dito cátion de metal divalente em uma solução aquosa, por exemplo, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, gluconato de cálcio, lactato de cálcio, sorbato de cálcio, ascorbato de cálcio, citrato de cálcio, propionato de cálcio, sulfato de cálcio, etc., ou misturas dos ditos compostos.

[00063] Como usado neste documento, um “tripolifosfato” é um composto que compreende polifosfato penta-ânion que é a base conjugada do ácido trifosfórico, por exemplo, tripolifosfato de sódio, comumente identificado como STPP (tripolifosfato de sódio) ou simplesmente como “TPP”.

[00064] Exemplos adicionais de substâncias capazes de estabelecer uma interação química com caseína e / ou quitosano, os quais podem ser utilizados como agentes de reticulação na presente invenção incluem vanilina [3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído], genipina [metil (1*R*,2*R*,6*S*)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato], etc.

[00065] Em uma modalidade particular, o agente de reticulação é um cátion de metal divalente selecionado a partir do grupo que consiste em  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e combinações dos mesmos, um tripolifosfato; vanilina; genipina; ou qualquer combinação dos mesmos. Em uma modalidade mais particular, o agente de reticulação é o cátion de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), TPP ou vanilina. Em uma outra modalidade particular, o agente de reticulação é  $\text{Ca}^{2+}$  e a reticulação adicionalmente compreende submeter a mistura contendo a matriz que consiste em caseína e quitosano, as bactérias probióticas e o agente de reticulação a um tratamento de pressão, assim como a um ciclo de pressão hidrostática, a uma pressão compreendida entre 100 e 800 MPa.

[00066] Em uma modalidade particular, as micropartículas da invenção compreendem dois ou mais agentes de reticulação, preferencialmente dois agentes de reticulação diferentes; exemplos



ilustrativos das ditas combinações de dois agentes de reticulação diferentes eventualmente presentes nas micropartículas da invenção incluem as combinações binárias de:

[00067] um tripolifosfato, por exemplo, TPP, e vanilina;

[00068] um tripolifosfato, por exemplo, TPP, e genipina;

[00069] um tripolifosfato, por exemplo, TPP, e um cátion de metal divalente o qual é farmacologicamente ou cosmeticamente aceitável, ou é adequado para utilização na alimentação humana ou animal, tal como por exemplo, um cátion de metal divalente selecionado a partir do grupo que consiste em  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e combinações dos mesmos;

[00070] vanilina e genipina;

[00071] vanilina e um cátion de metal divalente o qual é farmacologicamente ou cosmeticamente aceitável, ou é adequado para utilização na alimentação humana ou animal, tal como por exemplo, um cátion de metal divalente selecionado a partir do grupo que consiste em  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e combinações dos mesmos;

[00072] genipina e um cátion de metal divalente o qual é farmacologicamente ou cosmeticamente aceitável, ou é adequado para utilização na alimentação humana ou animal, tal como por exemplo, um cátion de metal divalente selecionado a partir do grupo que consiste em  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e combinações dos mesmos.

[00073] Se as micropartículas da invenção incluem pelo menos um agente de reticulação, a razão em peso do agente de reticulação e a matriz que consiste em caseína e quitosano pode variar dentro de uma vasta gama, dependendo do tipo do agente de reticulação. Em uma modalidade particular, quando o agente de reticulação é TPP, a razão de agente de reticulação (TPP):matriz (caseína e quitosano) é 1:0.1-800, vantajosamente 1:1-500, preferencialmente cerca de 1:100-300 aproximadamente. Em uma outra modalidade particular, quando o agente de reticulação é vanilina, a razão de agente de reticulação (vanilina):matriz

(caseína e quitosano) é 1:0.1-500, vantajosamente 1:1-250, preferencialmente cerca de 1:50-100 aproximadamente. Em uma outra modalidade particular, quando o agente de reticulação é  $\text{Ca}^{2+}$ , a razão de agente de reticulação ( fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ):matriz (caseína e quitosano) é 1:0.1-50, vantajosamente 1:1-25, preferencialmente cerca de 1:6-16 aproximadamente.

[00074] Em uma outra modalidade particular e opcional, as micropartículas da invenção adicionalmente compreendem um composto que protege a matriz e as bactérias probióticas durante o processo de secagem de micropartículas, ou de secagem da suspensão contendo as micropartículas da invenção por meio de métodos convencionais, por exemplo, por meio de secagem por pulverização, doravante, “agente protetor”. Virtualmente, qualquer composto correspondendo a essas características podem ser utilizadas como um agente protetor. Em uma modalidade particular, dito agente protetor é um sacarídeo ou, geralmente, um aditivo alimentar adequado, o qual, em adição ao seu papel protetor, age como um prebiótico. Como usado neste documento, o termo “prebiótico” diz respeito a um ingrediente alimentar não digerível que estimula o crescimento e/ou atividade probióticos. Os exemplos não limitativos ilustrativos de agentes protetores que podem ser utilizados dentro do contexto da presente invenção incluem lactose, manitol, sacarose, maltodextrina, glicose, sorbitol, etc., assim como substâncias com características prebióticas, tais como por exemplo, oligofrutose, pectina, inulina, galacto-oligossacarídeos, lactulose, oligossacarídeos do leite humano, fibra dietética, etc.; e qualquer combinação dos mesmos. Em uma modalidade particular, o agente protetor é manitol ou sacarosa. Se as micropartículas da invenção incluem um agente protetor, a razão em peso da matriz que consiste em caseína e quitosano e o agente protetor pode variar dentro de uma vasta gama; no entanto, em uma modalidade



particular, a razão em peso de matriz (caseína e quitosano): agente protetor é 1:0.1-5, tipicamente 1:0.5-4, preferencialmente cerca de 1:1.

Método para a obtenção das micropartículas da invenção

[00075] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método, doravante “método da invenção”, para a obtenção de micropartículas compreendendo uma matriz e uma bactéria probiótica, em que dita matriz consiste em caseína e quitosano (micropartículas da invenção), a qual compreende a mistura de caseína ou uma fonte de caseína, bactérias probióticas e quitosano.

[00076] A caseína pode ser incorporada como tal ou pode ser provida por uma fonte de caseína. Para efeitos de simplicidade, os termos “caseína” e “fonte de caseína” são usados de forma intercambiável nesta descrição. Virtualmente qualquer fonte de caseína pode ser usada para colocar o método da invenção em prática. A fonte de caseína pode ter uma origem bem diferente, por exemplo, leite, grãos, etc. Em uma modalidade particular, a fonte de caseína está na forma de uma solução ou suspensão aquosa; neste caso, a caseína pode estar na forma de ácido caseínico ou caseinato, por exemplo, caseinato de sódio, etc., ou qualquer outra forma solúvel de caseína. Embora outros caseinatos, por exemplo, caseinato de cálcio ou fosfocálcio possam ser usados, na prática é mais vantajoso usar caseinato de sódio. A solução ou suspensão aquosa contendo a fonte de caseína pode ser obtida por métodos convencionais conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, por exemplo, por meio da adição da fonte de caseína a um meio aquoso. Como usado neste documento, um “meio aquoso” é um meio compreendendo água, preferencialmente um meio contendo principalmente água, mais preferencialmente o meio aquoso consiste essencialmente de água. A quantidade de caseína que pode estar contida na dita solução aquosa pode variar dentro de um intervalo amplo; não obstante, em uma modalidade particular, a quantidade de caseína contida na dita solução aquosa é compreendida entre 0,1% e 10% (w/v),

preferencialmente entre 0,5% e 5%, mais preferencialmente entre 1% e 2%. A dita solução aquosa de caseína preferencialmente não contém qualquer solvente orgânico.

[00077] Para colocar o método da invenção em prática, uma suspensão de bactérias probióticas é vantajosamente preparada. Embora virtualmente qualquer bactéria probiótica possa ser usada, em uma modalidade particular, a dita bactéria probiótica é uma bactéria do gênero *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus*. Em uma modalidade mais particular, a dita bactéria probiótica é *L. plantarum* ou *L. casei*. Em uma modalidade específica, as bactérias probióticas são *L. plantarum* CECT 220 e *L. casei* CECT 475 T. Em outra modalidade particular, a dita bactéria probiótica é uma cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, tal como aquela comercializada sob a marca registrada BB-12®. A suspensão bacteriana compreende, além das bactérias probióticas, um meio adequado para as bactérias probióticas correspondentes. Os ditos meios são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Em uma modalidade particular, quando os ditos probióticos são bactérias do gênero *Lactobacillus*, por exemplo, *L. plantarum* ou *L. casei*, o dito meio compreende caldo para *Lactobacillus* de acordo com De Man, Rogosa e Sharpe, tal como aquele identificado como caldo MRS 110661 (Merck) [caldo MRS]; o dito meio permite que lactobacilos e outras bactérias do ácido láctico cresçam bem e é comumente usado para a cultura e enriquecimento de lactobacilos a partir de amostras clínicas e alimentos, particularmente produtos lácteos. Geralmente, o meio MRS compreende (em g/L): 10 g de polipeptona; 10 g de extrato de carne, 5 g de extrato de levedura, 20 g de glicose, 1,08 ml de Tween® 80 (mono-oleato ou polissorbato de sorbitano polietoxilado 80), 2 g de fosfato de potássio, 5 g de acetato de sódio, 2 g de citrato de amônio, 0,2 g de sulfato de magnésio, 0,05 g de sulfato de manganês. O pH do meio a uma temperatura de 25°C é  $6,4 \pm 0,2$ . Esse meio de cultura permite o desenvolvimento abundante de todas as espécies de lactobacilo. Peptona



e glicose são a fonte de nitrogênio, carbono e outros elementos necessários para crescimento bacteriano. O mono-oleato de sorbitano polietoxilado, magnésio, manganês e acetato proveem cofatores e podem inibir o desenvolvimento de alguns micro-organismos. Citrato de amônio age como um agente inibidor inibindo o crescimento de bactérias Gram-negativas.

[00078] A quantidade de bactérias probióticas que pode se apresentar na suspensão bacteriana pode variar dentro de um intervalo amplo; não obstante, em uma modalidade particular, a quantidade de bactérias probióticas presente na suspensão bacteriana é de pelo menos  $10^6$  CFU/ml, geralmente entre  $10^6$  e  $5 \times 10^{12}$  CFU/ml, preferencialmente entre  $10^8$  e  $10^{12}$  CFU/ml. Em uma modalidade particular e opcional, a suspensão bacteriana também contém um sacarídeo, tal como sacarose ou outro dissacarídeo adequado, tal como, por exemplo, maltose ou trealose; estes compostos geralmente desempenham um papel importante durante o processo de secagem das micropartículas visto que eles protegem ambas as membranas e proteínas da célula. Os dissacarídeos formam ligações de hidrogênio com as proteínas quando ocorre desidratação, o que permite a manutenção da estrutura da proteína e impede desnaturação. Por outro lado, parece que açúcares podem ser capazes de agir como substitutos de molécula de água durante a desidratação, cercando os grupos polares tanto das bicamadas fosfolipídicas quanto das membranas, mantendo a integridade estrutural da membrana e das proteínas. Se a dita suspensão bacteriana contém um dissacarídeo para as finalidades indicadas, por exemplo, uma sacarose, a quantidade de dissacarídeo (por exemplo, sacarose) presente na dita suspensão bacteriana será compreendida entre 0,1% e 10% (w/v) de dissacarídeo (por exemplo, sacarose), preferencialmente entre 1% e 3% (w/v). Em relação ao quitosano, virtualmente qualquer quitosano, ou derivado adequado do mesmo pode ser usado para colocar o método da invenção em prática; não obstante, em uma modalidade particular, o dito quitosano tem um grau de deacetilação

compreendido entre 60 e 100%, preferencialmente entre 75% e 95%, e um peso molecular compreendido entre 5 e 850 kDa, normalmente entre 25 e 300 kDa, preferencialmente entre 40 e 200 kDa, mais preferencialmente entre 50 e 150 kDa. Em uma modalidade particular, o quitosano está na forma de uma solução ou suspensão aquosa. A solução ou suspensão aquosa contendo quitosano pode ser obtida por métodos convencionais conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, por exemplo, por meio de adição de quitosano a um meio aquoso, por exemplo, água ou um meio contendo principalmente água. A quantidade de quitosano que pode estar contida na dita solução ou suspensão aquosa pode variar dentro de um intervalo amplo; não obstante, em uma modalidade particular, a quantidade de quitosano contida na dita solução ou suspensão aquosa está compreendida entre 0,05% e 1% (w/v), preferencialmente entre 0,1% e 0,3%, mais preferencialmente entre 1% e 2%. A dita solução ou suspensão aquosa de quitosano preferencialmente não contém qualquer solvente orgânico.

[00079] A ordem na qual a caseína, as bactérias probióticas e o quitosano são misturados na etapa de mistura do método da invenção é irrelevante. Em uma modalidade particular, a caseína e as bactérias probióticas são misturadas primeiro, e então o quitosano é adicionado; em outra modalidade particular, a caseína e o quitosano são misturados primeiro, e então as bactérias probióticas são adicionadas; em outra modalidade particular, as bactérias probióticas e o quitosano são misturados primeiro, e então a caseína é adicionada; e em outra modalidade particular, a caseína, as bactérias probióticas e o quitosano são adicionados e misturados. Em uma modalidade particular, como mencionado acima os ditos components são adicionados na forma de uma solução aquosa de caseína, uma suspensão de bactérias probióticas e uma solução aquosa de quitosano.



[00080] A caseína, bactérias probióticas e quitosano são preferencialmente misturados à temperatura ambiente, ou seja, a uma temperatura compreendida entre 18°C e 25°C, preferencialmente entre 20°C e 22°C, de modo a não afetar a viabilidade das bactérias probióticas, vantajosamente sob agitação.

[00081] A razão em peso da caseína e do quitosano presentes na mistura anteriormente à formação das micropartículas da invenção pode variar dentro de um intervalo amplo; não obstante, em uma modalidade particular, a dita razão em peso caseína:quitosano é de 1:0,01-0,5, preferencialmente 1:0,01-0,1, mais preferencialmente cerca de 1:0,02-0,07, ou em outras palavras, a razão em peso de quitosano:caseína presentes na mistura anteriormente à formação das micropartículas da invenção é de 1:1-150, preferencialmente 1:5-100, mais preferencialmente cerca de 1:14-40.

[00082] A razão das bactérias probióticas e os componentes de matriz (caseína e quitosano) presentes na mistura anteriormente à formação das micropartículas da invenção pode variar dentro de um intervalo amplo; não obstante, em uma modalidade particular, a dita razão de bactérias probióticas/matriz é de pelo menos  $10^6$  CFU por mg de matriz, geralmente compreendida entre  $10^6$  CFU/mg e  $10^{13}$  CFU/mg, preferencialmente entre  $10^9$  CFU/mg e  $10^{12}$  CFU/mg.

[00083] Como mencionado acima em uma modalidade particular, as micropartículas da invenção compreendem, adicionalmente, um agente de reticulação, tal como, por exemplo, um tripolifosfato (por exemplo, tripolifosfato de sódio (TPP)); vanilina; genipina; um cátion metálico divalente que é aceitável farmacêutica ou cosmeticamente, ou é adequado para uso em alimento humano ou animal, tal como, por exemplo, um metal divalente selecionado a partir do grupo consistindo em  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e combinações dos mesmos; ou qualquer combinação dos mesmos ou qualquer outra substância capaz de estabelecer uma interação química

com a caseína e/ou o quitosano. Em outra modalidade particular, as micropartículas da invenção compreendem dois ou mais agentes de reticulação, preferencialmente as combinações de dois diferentes agentes de reticulação mencionados acima com respeito às micropartículas da invenção.

[00084] Se as micropartículas da invenção compreendem pelo menos um agente de reticulação, o método da invenção compreende a adição do dito pelo menos um agente de reticulação à mistura de caseína, bactérias probióticas e quitosano. Em uma modalidade particular, o agente de reticulação (ou agentes) pode ser adicionado à dita mistura na forma de uma solução aquosa. Quando o agente de reticulação é o cátion de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), isso pode ser provido por uma fonte adequada do dito cátion, tal como um composto que dá origem a dito cátion divalente em uma solução aquosa, por exemplo, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, gluconato de cálcio, lactato de cálcio, sorbato de cálcio, ascorbato de cálcio, citrato de cálcio, propionato de cálcio, sulfato de cálcio, etc., ou misturas dos ditos compostos. Se as micropartículas da invenção incluem um agente de reticulação, a quantidade de agente de reticulação a ser adicionada depende da natureza do agente de reticulação como mencionado acima com respeito às micropartículas da invenção. Em todo o caso, o dito agente de reticulação será adicionado em uma quantidade suficiente de modo que, quando o agente de reticulação for TPP, a razão agente de reticulação (TPP):matriz (caseína e quitosano) será 1:0,1-800, vantajosamente 1:1-500, preferencialmente cerca de 1:100-300 aproximadamente; quando o agente de reticulação for vanilina, a razão agente de reticulação (vanilina):matriz (caseína e quitosano) será 1:0,1-500, vantajosamente 1:1-250, preferencialmente cerca de 1:50-100 aproximadamente; e quando o agente de reticulação for  $\text{Ca}^{2+}$ , a razão agente de reticulação ( $\text{Ca}^{2+}$  ou fonte de cálcio):matriz (caseína e quitosano) será 1:0,1-50, vantajosamente 1:1-25, preferencialmente cerca de 1:6-16 aproximadamente.



[00085] Após misturar a caseína, as bactérias probióticas e o quitosano sob as condições mencionadas anteriormente, ou seja, à temperatura ambiente e sob agitação, as micropartículas da invenção compreendendo uma matriz consistindo em caseína e quitosano, e uma bactéria probiótica são formadas. Em uma modalidade particular, as ditas micropartículas da invenção estão em suspensão no meio em que elas foram formadas.

[00086] Em seguida, se desejado, a suspensão resultando da mistura de caseína, bactérias probióticas e quitosano que contém as micropartículas da invenção está sujeita a um tratamento de secagem por métodos convencionais, vantajosamente por meio de secagem por pulverização ou por meio de liofilização, a fim de secar as micropartículas da invenção; este tratamento de secagem permite a obtenção das micropartículas da invenção na forma de pó, que contribui para o aumento da estabilidade das mesmas. Em uma modalidade particular, este tratamento de secagem, particularmente quando é realizado por meio de secagem por pulverização ou por meio de liofilização, compreende a adição de um agente protetor como mencionado acima com respeito às micropartículas da invenção, que protege a matriz e as bactérias probióticas durante o tratamento de secagem das mesmas, tal como, por exemplo, um sacarídeo ou geralmente um aditivo alimentar adequado, que, além do papel protetor, age como um prebiótico. Exemplos não limitantes, ilustrativos de sacarídeos que podem ser usados como agentes protetores dentro do contexto da presente invenção incluem lactose, manitol, sacarose, maltodextrina, glicose, sorbitol, etc., bem como polissacarídeos com características prebióticas, tais como, por exemplo, oligofrutose, pectina, inulina, galacto-oligossacarídeos, lactulose, oligossacarídeos do leite humano, fibra dietética, etc. Em uma modalidade particular, o agente protetor é manitol. Se as micropartículas da invenção incluem um agente protetor, isso é adicionado na quantidade adequada; embora a razão em

peso da matriz consistindo em caseína e quitosano e o agente protetor possa variar dentro de um intervalo amplo, em uma modalidade particular, a razão em peso matriz (caseína e quitosano): agente protetor é 1:0,1-5, tipicamente 1:0,5-4, preferencialmente cerca de 1:1.

[00087] Em uma modalidade particular na qual o método da invenção compreende secagem da suspensão de micropartículas da invenção, a dita suspensão e as micropartículas da invenção são secas por meio de secagem por pulverização; para esta finalidade, a suspensão contendo as micropartículas da invenção e/ou a mistura de caseína, bactérias probióticas e quitosano, e opcionalmente um agente de reticulação e/ou um agente protetor, é introduzida em uma secadora por pulverização e as condições de processamento [temperatura de entrada de ar, temperatura de saída de ar, pressão de ar, taxa de bombeamento de amostra, sucção e fluxo de ar] são controladas. A pessoa versada na técnica pode definir as condições de processamento que são mais adequadas para cada caso.

[00088] Se desejado, o método da invenção pode incluir uma etapa adicional para estabilizar as micropartículas da invenção. Em uma modalidade particular, quando a reticulação das micropartículas da invenção é realizada por meio de adição de um agente de reticulação, por exemplo, um cátion metálico divalente, tal como  $\text{Ca}^{2+}$ , e tratamento de alta pressão, o método da invenção compreende a introdução da suspensão contendo as micropartículas da invenção compreendendo, adicionalmente, um agente de reticulação, e/ou a mistura compreendendo caseína, bactérias probióticas, quitosano e agente de reticulação, em um recipiente adequado, por exemplo, uma sacola plástica que é vedada e sujeita a pelo menos um ciclo de pressão hidrostática, a uma pressão compreendida entre 100 e 800 MPa, preferencialmente entre 100 e 400 MPa, por um período de tempo compreendido entre 1 e 30 minutos, preferencialmente entre 2 e 10 minutos. Em uma modalidade particular, o dito tratamento de



alta pressão hidrostática compreende a aplicação na dita mistura compreendendo caseína, bactérias probióticas, quitosano e agente de reticulação de um ciclo de 5 minutos a 100 MPa, ou um ciclo de 2 minutos a 300 MPa. Em uma modalidade específica, a mistura compreendendo caseína, bactérias probióticas, quitosano e agente de reticulação ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é sujeita a um ciclo de 5 minutos a 100 MPa. Este tratamento de alta pressão é aplicado na mistura compreendendo caseína, bactérias probióticas, quitosano e agente de reticulação antes de sujeitá-la ao processo de secagem por meio de secagem por pulverização. Alternativamente, como a pessoa versada na técnica conhece, o tratamento de alta pressão é um tratamento que permite a reticulação das micropartículas *per se* sem a necessidade de incorporar um agente de reticulação, então as micropartículas da invenção poderiam ser reticuladas ao serem sujeitas a um tratamento com altas pressões, na ausência de agente de reticulação.

[00089] O método da invenção permite a obtenção das micropartículas da invenção na forma de um pó seco, que contribui para a estabilidade das micropartículas da invenção durante longos períodos de armazenamento sob condições controladas ou do meio ambiente, e pode também ser facilmente incorporado em produtos sólidos e líquidos pretendidos diferentes (por exemplo, alimentos, etc.).

[00090] As micropartículas obteníveis por meio do método da invenção têm as características das micropartículas da invenção e constituem um aspecto adicional da presente invenção.

[00091] Aplicações

[00092] As micropartículas da invenção têm a capacidade de encapsular bactérias probióticas e protegê-las durante processamento (obtendo micropartículas compreendendo uma matriz consistindo em caseína e quitosano, carregada com as ditas bactérias probióticas) e armazenamento ao longo de prolongados períodos de armazenamento sob condições controladas ou do meio ambiente e também para protegê-las das

condições “ácido-pépticas” durante trânsito através do trato gastrointestinal uma vez recolhido; a inativação das bactérias probióticas após incorporação nos produtos pretendidos diferentes (por exemplo, alimentos, etc.) é, assim, impedida ou substancialmente reduzida.

[00093] Adicionalmente, as micropartículas da invenção têm um forte efeito imunomodulador, portanto elas podem ser usadas na fabricação de uma composição moduladora do sistema imunológico para a prevenção e/ou tratamento de deficiências do sistema imunológico.

[00094] Portanto, em um outro aspecto, a invenção diz respeito a uma composição, doravante “composição da invenção”, selecionada a partir de:

[00095] (i) uma composição consistindo em uma pluralidade de micropartículas da invenção, ou em uma pluralidade de micropartículas obtenível por meio do método da invenção, ou em uma pluralidade de micropartículas da invenção e de micropartículas obteníveis por meio do método da invenção; e

[00096] (ii) uma composição compreendendo pelo menos uma micropartícula da invenção, e/ou uma micropartícula obtenível por meio do método da invenção, e um veículo alimentar, nutracêutico, cosmecêutico ou farmacêutico aceitável.

[00097] As características das micropartículas da invenção já foram definidas acima e são incorporadas neste documento por referência. Em uma modalidade particular, o tamanho médio das micropartículas da invenção é compreendido entre 0,5 e 125  $\mu\text{m}$ , preferencialmente entre 1 e 40  $\mu\text{m}$ , mais preferencialmente entre 2 e 12  $\mu\text{m}$ . “Tamanho médio” é entendido como o diâmetro médio da população de micropartículas, movendo-se em conjunto em um meio aquoso. O tamanho médio desses sistemas pode ser medido por métodos padrão conhecidos pela pessoa versada na técnica e são descritos na parte experimental abaixo, por exemplo. Em outra modalidade particular, as bactérias probióticas



presentes nas micropartículas da invenção são selecionadas a partir de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*; em uma modalidade mais particular, a dita bactéria probiótica é selecionada a partir de *L. plantarum* e *L. casei*. Em uma modalidade específica, as bactérias probióticas são *L. plantarum* CECT 220 e *L. casei* CECT 475 T. Em outra modalidade particular, a dita bactéria probiótica é uma cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, tal como aquela comercializada sob a marca registrada BB-12®.

[00098] Em outra modalidade particular, as micropartículas da invenção compreendem um agente de reticulação como mencionado acima, por exemplo, TPP, vanilina ou um cátion metálico divalente, por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ . Em outra modalidade particular, as micropartículas da invenção compreendem dois ou mais agentes de reticulação, preferencialmente as combinações de dois diferentes agentes de reticulação mencionados acima com respeito às micropartículas da invenção. Em outra modalidade particular, as micropartículas da invenção compreendem um agente protetor, tal como um sacarídeo, por exemplo, manitol. Em outra modalidade particular, as micropartículas da invenção estão na forma de um pó seco.

[00099] No primeiro caso, a composição da invenção (i) é feita somente e exclusivamente de micropartículas da invenção e/ou de micropartículas obteníveis por meio do método da invenção. Em uma modalidade particular, a dita composição da invenção (i) é selecionada a partir de:

[000100] uma composição A, compreendendo:

[000101] caseína, entre 40% e 60% em peso,

[000102] quitosano, entre 0,1% e 3,5% em peso,

[000103] bactérias probióticas, entre  $10^9$  CFU/g e  $5 \times 10^{12}$  CFU/g,

[000104] tripolifosfato de sódio, entre 0% e 0,15% em peso,  
e  
[000105] agente protetor, entre 0% e 60% em peso;  
[000106] onde as proporções em peso se referem ao peso total da composição;

[000107] uma composição B, compreendendo:  
[000108] caseína, entre 40% e 60% em peso,  
[000109] quitosano, entre 0,1% e 3,5% em peso,  
[000110] bactérias probióticas, entre  $10^9$  CFU/g e  $5 \times 10^{12}$  CFU/g,  
[000111] vanilina, entre 0% e 0.6% em peso, e  
[000112] agente protetor, entre 0% e 60% em peso;  
[000113] onde as proporções em peso se referem ao peso total da composição; e

[000114] uma composição C, compreendendo:  
[000115] caseína, entre 40% e 60% em peso,  
[000116] quitosano, entre 0,1% e 3,5% em peso,  
[000117] bactérias probióticas, entre  $10^9$  CFU/g e  $5 \times 10^{12}$  CFU/g,  
[000118]  $\text{Ca}^{2+}$ , entre 0% e 10% em peso, e  
[000119] agente protetor, entre 0% e 60% em peso,  
[000120] onde as proporções em peso se referem ao peso total da composição.

[000121] No segundo caso, a composição da invenção (ii) compreende pelo menos uma micropartícula da invenção e/ou uma micropartícula obtenível por meio do método da invenção, e um veículo alimentar, nutracêutico, cosmecêutico ou farmacêutico aceitável.

[000122] Em uma modalidade particular, a composição da invenção é um alimento ou alimentos compreendendo pelo menos uma micropartícula da invenção e/ou uma micropartícula obtenível por meio do



método da invenção, ou uma composição compreendendo uma pluralidade de micropartículas da invenção e/ou de micropartículas obteníveis por meio do método da invenção. Como usado neste documento, o termo “alimento” é qualquer substância ou produto de qualquer natureza, sólida ou líquida, natural ou processada que, devido a suas características, aplicações, componentes, preparação e estado de preservação, pode normal ou idealmente ser usado para algumas das seguintes finalidades: a) como nutrição normal para seres humanos ou animais ou como alimentos agradáveis; ou b) como produtos dietéticos, em casos especiais de alimento humano ou animal. O termo “alimentos” inclui todos os materiais naturais e produtos acabados de qualquer origem que, separadamente ou convenientemente misturados um ao outro, são adequados como alimento animal. Um alimento pronto para consumo é aquele que não precisa ser diluído por meio de uma solução aquosa adequada para consumo, por exemplo. Em princípio, os ingredientes presentes em um alimento pronto para consumo são equilibrados e não há necessidade de se adicionar ingredientes adicionais ao alimento para torná-lo pronto para consumo, tal considerado por uma pessoa versada na técnica. Um alimento concentrado é aquele no qual um ou mais ingredientes estão presentes a uma concentração mais alta do que em um alimento pronto para consumo, portanto para uso é necessário diluí-lo por meio de uma solução aquosa adequada para consumo, por exemplo. Exemplos não limitantes, ilustrativos de alimentos providos por esta invenção incluem ambos produtos lácteos e derivados, por exemplo, leites fermentados, iogurte, kefir, coalhada, queijos, manteigas, sorvetes, sobremesas à base de leite, etc., e produtos não lácteos, tais como produtos assados, bolos e doces, cereais, chocolates, geléias, sucos, outros derivados de fruta, óleos e margarinas, pratos preparados, etc.

[000123] Em outra modalidade particular, a composição da invenção é uma composição nutracêutica compreendendo pelo menos uma

micropartícula da invenção e/ou uma micropartícula obtenível por meio do método da invenção, ou uma composição compreendendo uma pluralidade de micropartículas da invenção e/ou de micropartículas obteníveis por meio do método da invenção. Como usado neste documento, o termo “composição nutracêutica” refere-se a uma composição adequada para uso em seres humanos ou animais, compreendendo um ou mais produtos naturais com ação terapêutica que provê um benefício para saúde ou foi associado com prevenção ou redução de doença, por exemplo, bactérias probióticas, etc., e inclui suplementos dietéticos apresentados em uma matriz não alimentar (por exemplo, cápsulas, pó, etc.) de um produto bioativo natural concentrado normalmente presente (ou não) nos alimentos e que, quando tomados em uma dose mais alta do que aquela existente nestes alimentos, exerce um efeito favorável na saúde que é maior do que o efeito que o alimento normal pode ter. Portanto, o termo “composição nutracêutica” inclui produtos de alimento isolado ou purificado bem como aditivos ou suplementos alimentares que são geralmente apresentados em formas de dosagem normalmente usadas oralmente, por exemplo, cápsulas, comprimidos, sachês, ampolas bebíveis, etc.; tais produtos proveem um benefício fisiológico ou proteção contra doenças, geralmente contra doenças crônicas. Se desejado, a composição nutracêutica provida pela invenção pode conter, além das bactérias probióticas, um ou mais nutracêuticos (produtos ou substâncias associadas à prevenção ou redução de doenças), por exemplo, flavonóides, ácidos graxos ômega-3, etc., e/ou um ou mais prebióticos (ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam atividade e/ou crescimento probiótico), por exemplo, oligofrutose, pectina, inulina, galacto-oligossacarídeos, lactulose, oligossacarídeos do leite humano, fibra dietética, etc.

[000124] Em outra modalidade particular, a composição da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma micropartícula da invenção e/ou uma micropartícula obtenível por meio



do método da invenção, ou uma composição compreendendo uma pluralidade de micropartículas da invenção e/ou de micropartículas obteníveis por meio do método da invenção, adequadas para administração oral, tópica, retal ou vaginal; para esse fim, a dita composição compreende um veículo farmacêuticamente aceitável compreendendo um ou mais excipientes adequados para administração oral, por exemplo, na forma de cápsula, pó, granulado, comprimido (revestido ou não revestido), sachê, matriz, suspensão, etc., ou um veículo farmacêuticamente aceitável compreendendo um ou mais excipientes adequados para administração tópica, por exemplo, na forma de creme, pomada, bálsamo, etc., ou um veículo farmacêuticamente aceitável compreendendo um ou mais excipientes adequados para administração retal, por exemplo, na forma de supositório, etc., ou um veículo farmacêuticamente aceitável compreendendo um ou mais excipientes adequados para administração vaginal, por exemplo, na forma de *bolus*, supositório, etc. Informações sobre excipientes adequados para a formulação de composições farmacêuticas pretendidas para administração oral, topical, retal ou vaginal, bem como sobre a produção das ditas composições farmacêuticas podem ser encontradas no livro "Tratado de Farmacia Galénica", por C. Faulí i Trillo, 10ª Edição, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

[000125] Em outra modalidade particular, a composição da invenção é uma composição cosmética compreendendo pelo menos uma micropartícula da invenção e/ou uma micropartícula obtenível por meio do método da invenção, ou uma composição compreendendo uma pluralidade de micropartículas da invenção e/ou de micropartículas obteníveis por meio do método da invenção. Como usado neste documento, o termo "composição cosmética" refere-se a uma composição adequada para uso em higiene pessoal de seres humanos ou animais, ou a fim de realçar a beleza natural ou alterar a aparência corporal sem afetar a estrutura ou funções do corpo humano ou animal, compreendendo um ou mais produtos

provendo tais efeitos. Se desejado, a composição cosmética provida pela invenção pode conter, além das bactérias probióticas, um ou mais produtos cosméticos, ou seja, substâncias ou misturas pretendidas a serem colocadas em contato com as partes externas do corpo humano ou animal (epiderme, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e a mucosa bucal, com a finalidade exclusiva ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, protegê-los, mantê-los em boa condição ou corrigir odores corporais. Exemplos ilustrativos de produtos cosméticos incluem os produtos contidos na lista INCI (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos).

[000126] Em outra modalidade particular, a composição da invenção é uma composição cosmecêutica compreendendo pelo menos uma micropartícula da invenção e/ou uma micropartícula obténível por meio do método da invenção, ou uma composição compreendendo uma pluralidade de micropartículas da invenção e/ou de micropartículas obténíveis por meio do método da invenção. Como usado neste documento, o termo "composição cosmecêutica" refere-se a uma composição adequada para uso no corpo ou corpo animal compreendendo um ou mais produtos cosmecêuticos (cosméticos funcionais, dermocosméticos ou cosméticos ativos), ou seja, produtos híbridos tópicos com características cosmético-farmacêuticas contendo ingredientes ativos tendo efeito na pele, cabelo e/ou unhas do usuário, a concentrações mais altas e mais eficazes, portanto eles são localizados em um nível intermediário entre cosmético e droga. Exemplos ilustrativos de produtos cosmecêuticos incluem óleos essenciais, ceramidas, enzimas, minerais, peptídeos, vitaminas, etc. A pessoa versada na técnica entenderá que as micropartículas da invenção ou as composições contendo-as podem ser parte de um alimento ou alimentos, ou de um produto nutracêutico, farmacêutico ou cosmecêutico, que constitui um aspecto adicional da



presente invenção. Os ditos produtos podem estar em uma forma líquida, semissólida ou sólida.

[000127] Adicionalmente, as micropartículas da invenção têm um forte efeito imunomodulador e favorecem a indução de uma resposta Th1 e/ou mudam a resposta imune para Th1, preferencialmente a partir de Th2 para Th1 (Exemplo 7), elas podem, portanto, ser usadas na fabricação de uma composição moduladora do sistema imunológico para a prevenção e/ou tratamento de uma deficiência do sistema imunológico, por exemplo, na prevenção e/ou tratamento de rejeição de transplante mediada por Th2, alergias e doenças associadas à alergia, imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências, infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares e/ou infecções das mucosas.

[000128] Portanto, em outro aspecto, a invenção diz respeito ao uso de uma micropartícula da invenção, ou de uma composição da invenção, ou de um produto alimentar, farmacêutico, cosmecêutico ou nutracêutico compreendendo pelo menos uma micropartícula da invenção ou dita composição da invenção, doravante “produto da invenção”, na fabricação de uma composição moduladora do sistema imunológico. Em outras palavras, de acordo com esse aspecto da invenção, a invenção diz respeito a uma micropartícula da invenção, ou uma composição da invenção, ou um produto da invenção para uso em uma composição moduladora de sistema imunológico.

[000129] Como usado neste documento, uma “composição moduladora de sistema imunológico”, doravante “composição imunomoduladora da invenção”, é uma composição que é capaz de estimular certas respostas no sistema imunológico, tornando-o mais reativo, por exemplo, interferindo no desenvolvimento das células envolvidas em resposta imune através da produção de citocinas específicas. Como usado neste documento, o termo “composição” inclui qualquer composição farmacêutica, composição alimentar (alimentar ou alimentares), composição

nutracêutica, etc., compreendendo a micropartícula da invenção, a composição da invenção, ou o produto da invenção descrito acima.

[000130] Os resultados mostrados no Exemplo 7 mostram claramente que a administração oral das micropartículas da invenção contendo *L. plantarum* para ácaros CD1, por um lado, induz um aumento sutil no número de linfócitos citotóxicos (mostrados claramente por uma redução na razão  $CD4^+/CD8^+$ ) (Figura 9), e, por outro lado, provoca um aumento na síntese interferon-gama (IFN-g) comparado com a produção de interleucina-6 (IL-6), mudando, assim, a resposta imune para um perfil Th1. Embora não desejado ser ligado a isso, esses resultados parecem indicar uma possível interação entre as micropartículas da invenção e o sistema imunológico, modificando o tipo de resposta imune e mudando-a para uma resposta Th1.

[000131] Portanto, em uma modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção é uma composição a qual preferencialmente induz uma resposta Th1 e/ou desloca a resposta imune para Th1, preferencialmente a partir de Th2 para Th1. De acordo com essa modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção principalmente ou preferencialmente estimula ou induz a resposta Th1 do sistema imunológico, tornando-o mais reativo através da produção de citocinas específicas, tais como, por exemplo, IFN-g, interferon-alfa (IFN-a), interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18), etc., no desenvolvimento das células envolvidas em resposta imune Th1. A pessoa versada na técnica pode determinar facilmente se a administração de micropartículas da invenção induz preferencialmente uma resposta imune Th1 e/ou muda a resposta imune a partir de Th2 para Th1 por meio de métodos convencionais, por exemplo, por meio de métodos baseados em quantificar citocinas específicas da resposta Th1 e opcionalmente, Th2, tais como, por exemplo, o ensaio descrito no Exemplo 7.



[000132] Em uma modalidade particular preferencial, a composição imunomoduladora da invenção é uma composição adequada para administração oral (às vezes sendo referida como “composição oral” nesta descrição para efeitos de simplicidade) e será apresentada em uma forma de dosagem sólida, líquida ou semissólida. Para esse fim, a dita composição imunomoduladora da invenção incluirá, juntamente com as micropartículas da invenção ou a composição da invenção ou o produto da invenção, um veículo farmacêuticamente aceitável; o dito veículo farmacêuticamente aceitável compreende um ou mais excipientes adequados para administração oral, por exemplo, na forma de cápsula, pó, granulado, suspensão, etc. A pessoa versada na técnica conhece os excipientes que são adequados para a formulação de composições farmacêuticas pretendidas para administração oral bem como os métodos para produzir as ditas composições. A título de ilustração, informações sobre excipientes adequados para a formulação de composições pretendidas para administração oral, bem como sobre sua produção, podem ser encontradas no livro “Tratado de Farmacia Galénica”, por C. Faulí i Trillo, 10ª Edição, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

[000133] Em outra modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção é uma composição oral para a prevenção e/ou tratamento de uma deficiência do sistema imunológico; a dita deficiência do sistema imunológico pode ser uma deficiência natural (genética) ou uma deficiência induzida, tal como uma deficiência induzida por um processo infeccioso, tensão, etc.

[000134] Em outra modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção é uma composição oral para a prevenção e/ou tratamento de:

[000135] rejeição de transplante mediada por resposta Th2,

[000136] alergias e doenças associadas à alergia,

[000137] imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências,

[000138] infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares, ou

[000139] infecções das mucosas.

[000140] Rejeição de transplante é um processo no qual o sistema imune do receptor de transplante ataca o órgão ou tecido transplantado. Devido a suas características, a composição imunomoduladora da invenção pode ser particularmente útil na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplante mediada por resposta Th2 (por exemplo, um órgão, tecido, etc.).

[000141] Alergia é um distúrbio de hipersensibilidade do sistema imunológico. Reações alérgicas ocorrem quando o sistema imunológico de uma pessoa reage a substâncias normalmente inofensivas no meio ambiente. Uma substância provocando uma resposta imune (reação alérgica) em um sujeito sensível a dita substância é conhecida como um "alérgeno". Quando um alérgeno entra no corpo de um sujeito que lhe é alérgico, o sistema imunológico do sujeito responde produzindo uma grande quantidade de anticorpos (IgE); exposição consecutiva ao mesmo alérgeno provoca a liberação de mediadores químicos, particularmente histamina, que produzirá os sintomas típicos de uma reação alérgica. Há uma grande variedade de alérgenos, a título de ilustração não limitante, os ditos alérgenos podem ser os extratos alergênicos de polens, os extratos alergênicos de animais, incluindo animais domésticos, insetos, ácaros, etc., os extratos alergênicos de alimentos ou produtos alimentares, metais, componentes presentes em saliva, pinças ou ferrões de insetos induzindo uma reação de sensibilidade em um sujeito, componentes presentes em plantas induzindo uma reação de sensibilidade em um sujeito, etc.

[000142] Dentre as alergias mais comuns presentes na população estão:



[000143] alergias a pólen de plantas, por exemplo, alergias a pólen de Gramineae (por exemplo, *Lolium perenne*, *Poa pratense*, *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Triticum sativa*, etc.), alergias ao pólen de outras gramíneas (por exemplo, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum vulgare*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Urtica dioica*, etc.), alergias a pólen de árvore (por exemplo, *Olea Europea*, *Platanus sp.*, *Cupresus sp.*, etc.);

[000144] alergias a animais, incluindo alergias a pele, pêlos ou penas de animal (por exemplo, cão, gato, cavalo, aves, etc.), alergias a insetos, por exemplo, alergia aos componentes presentes em saliva, pinças ou ferrões de inseto induzindo uma reação de sensibilidade em um sujeito (por exemplo, abelhas, vespas, mosquitos, mutucas, etc.), alergias a ácaros, por exemplo, dermatophagoides (por exemplo, *Dermatophagoides pteronyssimus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acaros Siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, etc.);

[000145] alergias a fungos (por exemplo, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, etc.);

[000146] alergias a alimentos ou componentes alimentares presentes em alimentos, por exemplo, peixe, frutas (abacaxi, kiwi, etc.);

[000147] alergias a metais (por exemplo, níquel, etc.).

[000148] Geralmente, é bastante comum que um sujeito sensível a um alérgeno específico também seja sensível a outros alérgenos diferentes.

[000149] A composição imunomoduladora da invenção pode ser usada oralmente para a prevenção e/ou tratamento de alergias em geral; em uma modalidade particular, a dita alergia é selecionada a partir do grupo de alergias indicadas acima, ou seja, a partir do grupo de alergias consistindo em alergias a pólen de plantas, alergias a insetos, alergias a ácaros, alergias a fungos; alergias a animais, alergias a componentes

alimentares presentes em alimentos, alergias a metais, alergias a poeira, etc., e as combinações das mesmas.

[000150] Embora não pareça ser estritamente necessário, em uma modalidade particular, a prevenção e/ou o tratamento das alergias por meio do uso da composição imunomoduladora da invenção pode ser favorecido pela administração do alérgeno provocando a alergia. Para esse fim, o dito alérgeno pode ser administrado ao sujeito juntamente com a composição imunomoduladora da invenção (administração simultânea da composição imunomoduladora da invenção e o alérgeno) ao incluir o alérgeno na formulação por si só da composição imunomoduladora da invenção ou pela administração do alérgeno em uma formulação independente, mas simultaneamente com a administração da composição imunomoduladora da invenção. Alternativamente, o alérgeno pode ser administrado ao sujeito em um período de tempo antes ou após a administração da composição imunomoduladora da invenção (administração sequencial da composição imunomoduladora da invenção e do alérgeno); neste caso, o alérgeno seria formulado em sua própria formulação. Embora virtualmente qualquer alérgeno possa ser administrado, nesta modalidade particular em uma modalidade específica, o dito alérgeno é um alérgeno provocando as alergias referidas nos parágrafos anteriores. Os ditos alérgenos podem ser obtidos por métodos convencionais conhecidos pelas pessoas versadas na técnica ou podem ser adquiridos no mercado.

[000151] A composição imunomoduladora da invenção pode ser usada oralmente para a prevenção e/ou tratamento de doenças associadas a alergias. A pessoa versada na técnica conhece as doenças geralmente associadas a alergias. A título de ilustração não limitante, as doenças associadas a alergias mais comuns são selecionadas a partir de asma e dermatite atópica.

[000152] Imunodeficiência é um estado patológico no qual a capacidade do sistema imunológico de lutar contra doenças infecciosas é



comprometida ou ausente; sob essas condições, o sistema imunológico não cumpre seu papel protetor correspondente, deixando o organismo vulnerável à infecção. De fato, imunodeficiências tornam as pessoas afetadas altamente suscetíveis a infecções. Geralmente, a maioria das imunodeficiências são imunodeficiências adquiridas (“imunodeficiência secundária”); não obstante, algumas pessoas nascem com defeitos em seu sistema imunológico (“imunodeficiência primária”). Pacientes transplantados tomando produtos medicinais para suprimir seu sistema imunológico como uma medida anti-rejeição de transplante e pacientes tendo um sistema imunológico superativo são encontrados dentre os sujeitos que podem ter imunodeficiência. Geralmente, pessoas com imunodeficiência tendem a ser particularmente vulneráveis a infecções oportunistas, além das infecções normais que poderiam afetar qualquer um.

[000153] Imunodeficiência pode ser imunodeficiência fisiológica, congênita ou adquirida. Geralmente em uma situação de imunodeficiência, as defesas do organismo contra patógenos diminuem com a alteração subsequente de equilíbrio de Th1/Th2, tal como, por exemplo, em imunodeficiências fisiológicas (por exemplo, em recém-nascidos, durante a gravidez, etc.), imunodeficiências primárias ou congênitas (por exemplo, doenças genéticas, tais como, por exemplo, agamaglobulinemia em síndrome de DiGeorge, etc.), ou em imunodeficiências adquiridas ou secundárias (por exemplo, imunodeficiências adquiridas como resultado de má nutrição, envelhecimento, tratamento com certos produtos medicinais, tais como agentes quimioterápicos, agentes antirreumáticos, imunossuppressores (administrados após transplante de órgão), glicocorticóides, etc.; Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), doenças autoimunes, etc.).

[000154] A composição imunomoduladora da invenção é útil para apoiar as defesas imunológicas naturais do organismo, por exemplo sob condições de estresse específicas tais como estresse psicofísica que,

se for extremamente intensa ou por um longo período, pode levar a uma situação de imunodeficiência clinicamente manifestada através de vulnerabilidade a infecções de intensidade variável.

[000155] Visto que a composição imunomoduladora da invenção modula o sistema imunológico preferencialmente ao induzir uma resposta de Th1 e/ou mudando as respostas imunes para Th1 (por exemplo de Th2 para Th1), por exemplo, também pode ser usado oralmente para a prevenção e/ou tratamento de patologias derivadas ou resultantes de imunodeficiências. A pessoa versada na técnica conhece as patologias derivadas de imunodeficiências, por exemplo, infecções, etc.

[000156] Portanto, a composição imunomoduladora da invenção pode ser útil na prevenção e/ou no tratamento de imunodeficiências de qualquer origem e as patologias resultantes, por exemplo, na prevenção e/ou no tratamento, oralmente, de infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares (por exemplo, bactérias, protozoários, vírus, etc.) bem como infecções das mucosas (por exemplo, infecções da cavidade oral, infecções do trato respiratório, infecções do trato gastrointestinal, infecções do trato urogenital, infecções da membrana mucosa, infecções da pele, etc.) e geralmente de todas as infecções derivadas das condições de imunodeficiência.

[000157] Em outra modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção pode ser usada no tratamento e/ou prevenção de infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares. Em uma modalidade particular, o dito agente patogênico intracelular é um agente patogênico eucariótico, tal como, por exemplo, um protozoário (por exemplo, *Plasmodium vivax* (que causa malária), *Leishmania* sp. (associado com Leishmaniose), *Entamoeba* sp., *Cryptosporidium* sp., etc. ou um fungo, um agente patogênico procariótico, tal como uma bactéria (por exemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Vibrio* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Listeria*



sp., *Brucella* sp., chlamydias, etc.), ou um vírus (por exemplo, vírus de DNA de cadeia dupla (dsDNA), por exemplo, adenovírus, herpesvírus, poxvírus, etc.), vírus de DNA de cadeia simples (ssDNA), por exemplo, parvovírus, etc., vírus de RNA de cadeia dupla (dsRNA), por exemplo, reovírus, etc., vírus de RNA de cadeia simples positiva ((+)ssRNA), por exemplo, picornavírus, togavírus, etc., vírus de RNA de cadeia simples negativa [(-)ssRNA], por exemplo, ortomixovírus, rhabdovírus, etc., vírus de RNA de cadeia simples de transcrição reversa (ssRNA-RT), por exemplo, retrovírus, etc.; ou vírus de RNA de cadeia dupla de transcrição reversa (dsRNA-RT), por exemplo, hepadnavírus, etc.).

[000158] Em outra modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção pode ser usada no tratamento e/ou prevenção das infecções das mucosas; a título de ilustração não limitante, a dita mucosa pode ser mucosa da cavidade oral, mucosa do trato gastrointestinal, mucosa do trato urogenital e mucosa do trato respiratório, etc. Geralmente, essas infecções podem ser causadas por patógenos intracelulares. Em uma modalidade particular, as infecções das mucosas são causadas por enterobactérias (por exemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Vibrio* sp., etc.), enterovírus (por exemplo, calicivírus, rotavírus, adenovírus, astrovírus, etc.) ou protozoário (por exemplo, *Entamoeba* sp., *Cryptosporidium* sp., *Leishmania* sp., etc.).

[000159] A composição imunomoduladora da invenção preferencialmente adequada para administração oral pode ser preparada por métodos conhecidos pelas pessoas versadas na técnica considerando-se a natureza particular dos ingredientes ativos nela presentes, os quais incluem material vivo, especificamente bactérias probióticas, e preferencialmente pelo método provido por esta invenção visto que as micropartículas assim produzidas protegem as ditas bactérias probióticas durante processamento, armazenamento e administração, particularmente

durante trânsito através do trato gastrointestinal (administração oral). Adicionalmente, após serem recolhidos, eles facilitam a liberação de bactérias probióticas no local desejado, protegendo-os das condições “ácido-pépticas” do trato gastrointestinal superior, particularmente do estômago.

[000160] Em uma modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção está em uma forma de dosagem única para administração uma ou várias vezes ao dia, de acordo com o tipo e a severidade da patologia a ser tratada e a idade e o peso do sujeito.

[000161] Em uma modalidade particular, as micropartículas da invenção presentes na composição imunomoduladora da invenção estão na forma de um pó seco ou de um liofilizado, opcionalmente presente em um veículo adequado para administração a um sujeito. Geralmente, os ingredientes ativos (micropartículas, composição ou produto da invenção) são incluídos nas composições adequadas.

[000162] Portanto, em uma modalidade particular, a composição imunomoduladora da invenção compreende um veículo alimentar, farmacêutico, ou nutracêutico aceitável. Em uma modalidade específica, as composições farmacêuticas, composições nutracêuticas ou produtos alimentares providos por esta invenção proveem um veículo adequado para as bactérias probióticas. Portanto, em uma modalidade específica, a composição imunomoduladora da invenção compreende uma composição farmacêutica, composição nutracêutica ou está compreendida em um produto alimentar. Exemplos não limitantes, ilustrativos incluem produtos medicinais, produtos dietéticos, produtos derivados de leites, tais como iogurte, queijo, creme, doces, sucos de fruta, etc., e podem incluir, se desejado, como mencionado acima, outras substâncias benéficas para o organismo, tais como, por exemplo, vitaminas, sais minerais, outros ingredientes ativos compatíveis, tais como, por exemplo, agentes prebióticos, fibras, etc.



[000163] Como mencionado acima, esse aspecto da invenção pode ser alternativamente expresso como uma micropartícula da invenção, ou uma composição da invenção, ou um produto da invenção para uso em uma composição moduladora do sistema imunológico (composição imunomoduladora da invenção). As características da composição imunomoduladora referidas acima são aplicáveis neste documento *mutatis mutandi*. Em uma modalidade particular preferencial, a dita composição moduladora do sistema imunológico induz preferencialmente uma resposta Th1 e/ou muda a resposta imune para Th1; preferencialmente de Th2 para Th1. Do mesmo modo, em uma modalidade particular, a dita composição moduladora do sistema imunológico compreende um veículo alimentar, farmacêutico ou nutracêutico aceitável além da micropartícula da invenção, a composição da invenção ou o produto da invenção. Em outra modalidade particular, a dita composição moduladora do sistema imunológico compreendendo micropartículas da invenção, uma composição da invenção, ou um produto da invenção, está na forma de uma composição farmacêutica, composição nutracêutica ou está alternativamente compreendida em um produto alimentar. Em outra modalidade particular, as micropartículas presentes na dita composição moduladora do sistema imunológico estão na forma de um pó seco.

[000164] A invenção também diz respeito a uma micropartícula da invenção, ou uma composição da invenção, ou um produto da invenção para ser usado oralmente na prevenção e/ou no tratamento de uma deficiência do sistema imunológico (por exemplo, uma deficiência natural ou uma deficiência induzida do sistema imunológico). Em uma modalidade particular, a dita micropartícula da invenção está em uma composição farmacêutica formulada para administração oral. Em outra modalidade particular, a dita composição da invenção é uma composição farmacêutica formulada para administração oral. Em outra modalidade particular, o dito

produto da invenção é um produto farmacêutico adequado para administração oral.

[000165] Do mesmo modo, a invenção também diz respeito a uma micropartícula da invenção, uma composição da invenção, ou um produto da invenção para ser usado oralmente na prevenção e/ou no tratamento de rejeição de transplante mediada por Th2; alergias e doenças associadas à alergia; imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências; infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares, ou infecções das mucosas [as características da rejeição de transplante mediada por Th2, alergias e doenças associadas à alergia; imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências; infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares ou infecções das mucosas já foram mencionadas acima e são incorporadas por referência]. Em uma modalidade particular, a dita micropartícula da invenção está em uma composição farmacêutica formulada para administração oral. Em outra modalidade particular, a dita composição da invenção é uma composição farmacêutica formulada para administração oral. Em outra modalidade particular, o dito produto da invenção é um produto farmacêutico adequado para administração oral.

[000166] Em outro aspecto, a invenção diz respeito a um método para a prevenção e o tratamento de uma deficiência do sistema imunológico ou patologia em um sujeito, que compreende a administração oral a um sujeito com necessidade de tratamento, uma quantidade eficaz de uma composição imunomoduladora da invenção, ou de micropartículas da invenção, ou de uma composição da invenção, ou de um produto da invenção.

[000167] Como usado neste documento, o termo “deficiência do sistema imunológico ou patologia” em um sujeito compreende ambas as deficiências do sistema imunológico natural e induzido, tais como doenças nas quais um tratamento baseado na resposta Th-1 pode ser benéfico, por



exemplo, rejeição de transplante mediada por Th2; alergias e doenças associadas à alergia; imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências; infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares, ou infecções das mucosas. As características da rejeição de transplante mediada por Th2, alergias e doenças associadas à alergia; imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências; infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares ou infecções das mucosas já foram mencionadas acima e são incorporadas por referência.

[000168] Como usado neste documento, o termo “sujeito” inclui qualquer animal mamífero incluindo o ser humano.

[000169] As características da composição imunomoduladora da invenção, as micropartículas da invenção, a composição da invenção, ou o produto da invenção já foram definidos acima e são incorporados neste documento por referência.

[000170] As características da forma de apresentação e administração da composição imunomoduladora da invenção, as micropartículas da invenção, a composição da invenção, ou o produto da invenção já foram mencionados acima e são incorporados por referência.

[000171] Para administração ao sujeito com necessidade de tratamento, a composição imunomoduladora da invenção, as micropartículas da invenção, a composição da invenção, ou o produto da invenção podem estar incluídos em um veículo alimentar, farmacêutico, ou nutracêutico aceitável, ou podem estar presentes em uma composição farmacêutica, composição nutraceutical ou compreendidos em um produto alimentar.

[000172] Os exemplos seguintes ilustram a invenção e não devem ser considerados como limitantes da mesma.

### **EXEMPLOS**

[000173] Os seguintes exemplos descrevem a produção de micropartículas de caseína e quitosano que pode incorporar bactérias probióticas e que são capazes de proteger ditos microorganismos a partir dos fatores mencionados acima (processamento, armazenamento e/ou trânsito através do trato gastrointestinal). A menos que indicado o contrário, os métodos gerais usados são descritos abaixo para realizar esses exemplos.

### **Métodos gerais**

#### **I. Método geral para produzir micropartículas de caseína e quitosano vazias**

[000174] O método para produzir micropartículas de caseína e quitosano compreende dissolver caseinato de sódio (ANVISA, Madrid, Espanha) em um meio aquoso seguido por adicionar um volume específico de solução de quitosano e opcionalmente uma quantidade específica de agente de reticulação sob agitação magnética e com fluxo constante. As micropartículas formadas são secas após que a suspensão contendo as micropartículas tenha passado por secador por atomização após a adição de um agente protetor tal como manitol.

[000175] A menos que indicado o contrário, o quitosano usado nesses exemplos foi Quitosano caracterizado com um grau de deacetilação de 90.2% e um peso molecular de  $105 \pm 0.01$  kDa, de Guinama (Valencia, Espanha).

[000176] A menos que indicado o contrário, o secador por atomização usado nesses exemplos foi o Mini Secador por atomização Büchi B-290 com acessórios Büchi, Ciclo Inerte B-295 e Desumidificador B-296, Büchi Switzerland, Flawil (Suíça).

[000177] O manitol usado nesses exemplos foi D-manitol, E-421, de 99.4% de pureza de Guinama (Valencia, Espanha), apesar disto, o D-manitol de Sigma-Aldrich também foi usado algumas vezes.

#### **II. Caracterização de micropartícula**



[000178] O tamanho das micropartículas foi determinado por meio de microscopia ótica usando um microscópio Olympus CH40 com câmera Colorview Soft Imaging Systems.

[000179] A morfologia das micropartículas foi adicionalmente observada usando microscopia eletrônica de varredura (Zeiss, DSM 940A, Alemanha). Para este fim, as micropartículas foram revestidas com uma camada de ouro molecular de 9 nm (Emitech K550, equipamento Sputter-Coater, Reino Unido) e as fotografias foram tiradas com um microscópio Zeiss DMS 940 A (Estados Unidos).

### **III. Método geral para preparar as suspensões de bactérias probióticas**

[000180] As bactérias probióticas usadas para realizar esses exemplos foram *Lactobacillus plantarum* CECT 220 e *Lactobacillus casei* CECT 475 T isoladas a partir de silagem de milho e queijo, respectivamente. Os produtos liofilizados de ambos microorganismos foram revitalizados em uma Caldo MRS (Merck, Barcelona) a 37°C sob atmosfera anaeróbica (85% nitrogênio, 10% hidrogênio, 5% dióxido de carbono) em câmara anaeróbica (MACS 500 AIRLOCK, AES Chemunex, Espanha). 500 µL alíquotas de suspensões estoque que foram mantidas congeladas a -85°C até o tempo de uso foram preparadas a partir dessas culturas revitalizadas.

[000181] As suspensões para trabalho foram preparadas conforme segue. 100 µL da alíquota do microorganismo correspondente foram transferidas para 10 mL Caldo MRS. Após incubação por 12 horas/37°C sob condições anaeróbicas, a contagem microscópica foi realizada em uma Câmara Thoma a fim de calcular o volume de amostra que deve ser transferido a um frasco de 50 mL contendo o Caldo MRS para uma contagem de  $10^6$  CFU/mL (unidades de formação de colônia por milímetro). Após a inoculação daquele volume, os frascos foram incubados nas condições anteriormente descritas por 24 horas até alcançar a fase de

crescimento estacionário precoce. A população bacteriana foi monitorada e contada por meio de semear as diluições decimais correspondentes (0.1% de Caldo BPW (Merck, Barcelona)) em Ágar MRS (Merck, Barcelona) em cada tempo de amostragem.

#### **IV. Método geral para produzir micropartículas de caseína e quitosano contendo bactérias probióticas encapsuladas**

[000182] O método geral para produzir micropartículas de caseína e quitosano contendo bactérias probióticas encapsuladas compreende dissolver caseinato de sódio (ANVISA, Madrid, Espanha) em um meio aquoso seguido por adicionar um volume específico de suspensão bacteriana obtido de acordo com o método descrito na seção III acima e depois de ser centrifugado e resuspendido em um volume específico de uma solução de 2% de sacarose (w/v), sob agitação e com fluxo constante. Um volume específico de solução de quitosano e opcionalmente um volume específico de agente de reticulação são então adicionados.

#### **V. Método geral para manchar as bactérias probióticas e suas encapsulações**

[000183] Este método foi realizado para confirmar qualitativamente que as bactérias estão presas dentro das micropartículas, i.e., que a matriz consistindo em caseína e quitosano reveste as bactérias probióticas, através de microscopia ótica de fluorescência.

[000184] O método para manchar as bactérias compreende preparar uma solução saturada de rodamina B isotiocianato em tampão fosfato (pH 7.4), filtrá-la através de uma membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  e adicioná-la a um volume específico de suspensão bacteriana obtido de acordo com o método descrito nas seções anteriores. Uma vez que a mistura tenha sido centrifugada a 3,000 rpm por 15 minutos para remover o excesso de rodamina no sobrenadante, as bactérias manchadas são resuspendidas em um volume específico de uma solução de 2% de sacarose (w/v). As



bactérias manchadas são encapsuladas de acordo com o método descrito na seção anterior.

#### **VI. Método geral para quantificar bactérias viáveis presentes na formulação, e determinar o ciclo de morte bacteriana ao longo do processo**

[000185] Para contar as bactérias encapsuladas, 1 mL de uma solução de 1% NaOH (pH 10) foi adicionado a um peso conhecido de microcápsulas (500 µg, aproximadamente), e após misturar em vortex por 5 minutos as diluições decimais correspondentes foram realizadas em Caldo BPW 0.1% (Merck, Barcelona, Espanha) e semeadas em uma Placa MRS ágar. Após a incubação a 37°C sob condições anaeróbicas (câmara MACS 500 Airlock, AES Chemunex, Espanha) por 24-48 horas, realizou-se a contagem de colônias.

[000186] Levando em consideração a quantidade de bactérias inicialmente incluídas na formulação antes que elas passem pelo secador por atomização por cada grama de formulação e as contagens obtidas no fim do processo, os ciclos de morte bacteriana são determinados por meio da seguinte equação:

[000187] Ciclos de morte bacteriana:  $\log (\text{CFU/g inicial}) - \log (\text{CFU/g recuperado})$

#### **VII. Método para avaliar a resistência de bactérias lácticas microencapsuladas em meio gastrointestinal simulado**

[000188] A resistência gastrointestinal de *L. plantarum* e *L. casei* foi avaliada de acordo com o método descrito por Vinderola *et al.*, 2003.

[000189] Para conduzir o estudo, 10 µL da cultura bacteriana líquida ou 500 µg da formulação de micropartículas na forma de pó foram adicionadas a tubos de PVC com 0,99 mL de simulador gástrico a um pH 2,5. Como muitos tubos foram usados como tempos de tratamento planejados para serem avaliados, especificamente 5 tubos com simulador

gástrico correspondendo aos tempos: 0 e 2 horas (resistência a simulador gástrico)) e 0,3 entre 6 horas (resistência a simulador intestinal).

[000190] O simulador gástrico foi preparado de acordo com farmacopéia e tinha a seguinte composição para um litro de solução:

[000191] - 2 g de NaCl

[000192] - 3,2 g de pepsina (Sigma, Barcelona, Espanha)

[000193] - 7 mL de HCl(v/v) 37%

[000194] A pepsina foi dissolvida em HCl e a mistura foi então adicionada a 1 litro de água do tipo I. O pH final foi ajustado para 1,2 ou 2,5 dependendo do teste a ser conduzido com HCl (v/v) 37%.

[000195] O simulador intestinal também preparado a partir de receita farmacopéia foi feito de:

[000196] -6,8 g de fosfato de potássio monobásico (Panreac, Madrid, Espanha) dissolvido em 250 mL de água do tipo I e ao qual 77 mL de 0,2 N NaOH foi adicionado

[000197] - 500 mL de água

[000198] - 10 g de pancreatina (Sigma, Barcelona, Espanha)

[000199] O pH foi ajustado para 6,8 com 0,2 N NaOH ou com 0.2 N HCl.

[000200] Os 5 tubos foram mantidos a 37°C em um misturador orbital (150 rpm) até o tempo de extração de amostra e avaliação de sobrevivente. Após o tempo de tratamento em simulador gástrico (2 horas) tenha decorrido, os tubos de PVC foram centrifugados (13,000 rpm/10 minutos) e o sobrenadante foi descartado. Para avaliar o tempo de 2 horas, o pelete de um dos tubos foi submetido a um tratamento para ruptura das microcápsulas com 1% NaOH (pH 10) descrito acima. Os peletes dos tubos remanescentes foram resuspensores em 0,99 mL de simulador intestinal para avaliar a resistência nesse meio em tempos de 0,3 entre 6 horas (2, 5 e 8 horas a partir do início do estudo). Depois que esses tempos foram decorridos, os tubos foram centrifugados, os sobrenadantes foram



descartados e os peletes foram tratados com 1% NaOH (tratamento para a ruptura das microcápsulas) a fim de avaliar os sobreviventes remanescentes.

[000201] A contagem de bactérias viáveis foi realizada usando o método de contar numa Placa MRS ágar descrita acima. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas sob condições anaeróbicas determinando o número de unidades formando colônia. A fração de bactérias sobreviventes foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$[000202] \quad \text{Log fração sobrevivente} = \text{Log} \left( \frac{N_t}{N_0} \right)$$

[000203] Em que  $N_t$  representa o total de bactérias ácidas lácticas viáveis após cada tempo de tratamento, e  $N_0$  representa o número inicial de bactérias ácidas lácticas (LAB) inoculadas (Bao et al., 2010).

#### **VIII. Método para avaliar a estabilidade de bactérias lácticas microencapsuladas ao longo do tempo de armazenamento sob condições ambientais**

[000204] O estudo de estabilidade de bactérias microencapsuladas foi conduzido por meio de avaliar a viabilidade bacteriana ao longo do tempo de armazenamento em temperatura ambiente (25°C).

[000205] Para este fim, 500 µg de amostras foram tirados das formulações de microcápsulas mantidas em recipiente de vidro hermeticamente fechado, ditas amostras foram sujeitadas ao método de avaliação de sobrevivente e ruptura descrito acima. Como uma medida de controle, o estudo foi conduzido de maneira similar tanto em suspensões frescas e em produtos liofilizados de ambos microorganismos.

#### **EXEMPLO 1**

**Preparação e caracterização de micropartículas de caseína e quitosano contendo bactérias probióticas encapsuladas do gênero *Lactobacillus plantarum***

[000206] Tipos diferentes de micropartículas contendo bactérias foram preparadas, todas elas com caseína como o polímero base modificado com quitosano. O método para preparar ditas micropartículas dependeu da presença ou ausência de agente de reticulação e do tipo de agente de reticulação usado.

[000207] (Ap) Micropartículas de caseína modificadas com quitosano na ausência de agente de reticulação

[000208] 1,5 mL da suspensão bacteriana ( $1,2 \times 10^{12}$  CFU/mL) descrita na seção III dos "Métodos gerais" foi adicionado a 25 mL de uma solução aquosa a 10 mg/ml de caseinato de sódio após ter sido centrifugado e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 10 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1,6 mg/mL preparada em um meio aquoso com pH 5,5-6 por meio de adicionar 400 mg de quitosano a 250 ml de água purificada sob agitação e ajustar o pH com 0,1 N HCl, foram então adicionados à mistura.

[000209] Após cinco minutos de incubação, 100 mg de manitol foram adicionados à mistura antecedente e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização. As condições de processamento eram:

[000210] Temperatura de entrada de ar: 85°C

[000211] Temperatura de saída de ar: 40-45°C

[000212] Pressão de ar: 6 bar ( $6 \times 10^5$  Pa)

[000213] Taxa de bombeamento de amostra: 3.5 mL/min

[000214] Sucção: 100%

[000215] Fluxo de ar: 600 L/h

[000216] As micropartículas obtidas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação. O mesmo estudo foi conduzido na ausência de bactérias para verificar como a presença desses probióticos afeta as características físicoquímicas das partículas. A figura 1 mostra as imagens de microscopia ótica obtidas para as partículas,



tanto na presença quanto na ausência de probióticos. Pode ser confirmado nas imagens que o tamanho de partícula não é afetado pela presença de bactérias encapsuladas.

[000217] Por outro lado, a fim de confirmar que as bactérias estão encapsuladas nas micropartículas de caseína e quitosano, o mesmo estudo foi repetido usando bactérias manchadas com marcador fluorescente de acordo com o método descrito na seção V dos “Métodos gerais”. Figura 2 mostra as imagens de microscopia ótica fluorescentes de ambas as bactérias livres de mancha (A) e bactérias encapsuladas (B). A fluorescência observada nas micropartículas (A) é devida exclusivamente às bactérias. Já que a presença de bactérias fora das não é observada de maneira alguma, confirma-se que elas estão encapsuladas.

[000218] (Bp) Micropartículas de caseína e quitosano na presença de vanilina

[000219] 0,5 mL de uma solução aquosa de vanilina (5 mg/mL) foram adicionados a 25 mL de uma solução aquosa 10 mg/ml de caseinato de sódio. Após (pelo menos) 15 minutos de incubação, 0,3 mL da suspensão bacteriana ( $4,7 \times 10^{11}$  CFU/mL) descrita na seção III dos “Métodos gerais” foram adicionados à mistura, após terem sido centrifugados e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 10 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1.6 mg/mL preparada em um meio aquoso com pH 5.5-6 foram então adicionados à mistura.

[000220] Após cinco minutos de incubação, 250 mg de manitol foi adicionado à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização. As condições de processamento eram similares às aquelas descritas na seção Ap.

[000221] As micropartículas usadas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação.

[000222]

[000223] (Cp) Micropartículas de caseína e quitosano na presença de TPP

[000224] 1,5 mL da suspensão bacteriana ( $4.7 \times 10^{11}$  CFU/mL) descrito na seção III dos "Métodos gerais" foi adicionado a 25 mL de uma solução aquosa a 10 mg/ml de caseinato de sódio, após ter sido centrifugado e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 10 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1,6 mg/mL preparada em um meio aquoso com pH 5,5-6 foram então adicionados à mistura. Após cinco minutos de incubação, 0.8 mL de uma solução de TPP 1 mg/mL foram adicionados.

[000225] 250 mg de manitol foram adicionados depois de cinco minutos à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização. As condições de processamento eram similares às aquelas descritas na seção Ap.

[000226] As micropartículas obtidas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação.

(Dp) Micropartículas de caseína e quitosano na presença de sais de cálcio

[000227] 4 mL da suspensão bacteriana ( $1,2 \times 10^{12}$  CFU/mL) descrita na seção III dos "Métodos gerais" foram adicionados a 25 mL de uma solução aquosa a 10 mg/ml de caseinato de sódio, após terem sido centrifugados e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 2 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1.6 mg/mL preparada em um meio aquoso com pH 5.5-6 foram então adicionados à mistura. Após cinco minutos de incubação, 2 mL de uma solução de 2% acetato de cálcio (w/v) e 2 mL de uma solução de 2% cloreto de cálcio (w/v) foram adicionados.

[000228] 100 mg de manitol foram adicionados depois de cinco minutos à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica



de secagem por atomização. As condições de processamento eram similares às descritas na seção Ap.

[000229] As micropartículas obtidas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação.

[000230] Figura 3 mostra a imagem de microscopia ótica de fluorescência obtida para as micropartículas, na qual a presença de bactérias livres não foi observada.

[000231] A tabela 1 resume os ciclos de morte de *L. plantarum* que são derivadas a partir do processo de encapsulamento em micropartículas de caseína e quitosano.

**Tabela 1.** Influência do método de produção de micropartícula de caseína na sobrevivência de *Lactobacillus plantarum*

Tipo de formulação	Contagem de bactérias antes da secagem por SD (CFU/g)		Contagem de bactérias após a secagem por SD (CFU/g)		Ciclos de morte bacteriana devido ao processo para obter as micropartículas (log CFU)
Ap	3,67	x	2,50	x	2,17
	$10^{12}$		$10^{10}$		
Bp	2,42	x	2,50	x	0,99
	$10^{11}$		$10^{10}$		
Cp	1,21	x	7,50	x	1,21
	$10^{12}$		$10^{10}$		
Dp	9,28	x	1,70	x	2,74
	$10^{12}$		$10^{10}$		

SD: Secagem por Atomização

[000232] Os tamanhos das micropartículas obtidas são similares em todas as formulações abrangendo a faixa de  $7\pm 4$   $\mu\text{m}$ . No entanto, os ciclos de morte bacteriana são mais baixos quando vanilina ou TPP são usados como agentes de reticulação.

[000233] De acordo com os resultados obtidos, as formulações Bp e Cp são aquelas que oferecem melhor proteção aos probióticos durante o processo para obtê-los. Portanto, ambas formulações foram escolhidas para realizar estudos sobre a resistência gastrointestinal e viabilidade durante o armazenamento.

## **EXEMPLO 2**

### **Avaliação da estabilidade de *Lactobacillus plantarum* encapsulados ao longo do tempo de armazenamento sob condições ambientais**

[000234] As formulações Ap, Bp, Cp e Dp descritas no Exemplo 1 foram usadas para avaliar a sobrevivência das bactérias sob condições ambientais (25°C) ao longo do tempo, usando ambas as suspensões frescas e produtos liofilizados como um controle comparativo. Figura 4 mostra os resultados obtidos.

[000235] Os resultados mostram claramente que no primeiro mês de estudo existe uma perda de 7 unidades logarítmicas em as contagens de bactérias frescas em suspensão, e no terceiro mês, perdas de 4,5 unidades logarítmicas foram observadas no caso de bactérias em forma liofilizada. No entanto, quando esses probióticos foram encapsulados em qualquer uma das micropartículas de caseína e quitosano descritas no Exemplo 1, suas contagens mantiveram-se constantes, nenhuma perda significativa foi observada durante os 8 meses de estudo. Estes resultados confirmam que as formulações descritas na presente invenção permitem pelo menos o aumento da viabilidade bacteriana sob condições ambientais em duas vezes a respeito das bactérias liofilizadas.

## **EXEMPLO 3**



**Avaliação da resistência das bactérias probióticas encapsuladas  
do gênero *Lactobacillus plantarum* a um meio gastrointestinal  
simulado**

[000236] As formulações Ap, Bp, Cp e Dp descritas no Exemplo 1 foram usadas para avaliar a resistência das bactérias encapsuladas em um meio gastrointestinal simulado seguindo o método descrito na seção VII dos “Métodos gerais”. A figura 5 mostra os resultados obtidos para ambas formulações ao longo do processo, assim como a resistência obtidas for bactérias não encapsuladas livres. No caso das bactérias livres (bactérias liofilizadas não encapsuladas), o número de contagens viáveis diminui gradualmente ao longo do estudo, resultando com uma perda média de 4 unidades logarítmicas. No caso das formulações Ap e Dp, as contagens foram mantidas praticamente constantes ao longo de todo o ensaio, sendo significativamente mais altas do que o produto liofilizado tanto ao fim do ensaio em simulador gástrico (2 horas) e ao fim do ensaio em simulador intestinal (8 horas). Nas formulações Bp e Cp uma diminuição na concentração foi observada durante a residência em simulador gástrico, as contagens ao tempo de 2 horas sendo significativamente similar ao produto liofilizado. No entanto, uma vez que as foram transferidas ao simulador intestinal, um aumento nas contagens foi observado, sendo significativamente mais altas que o produto liofilizado ao fim do ensaio (8 horas). Este aumento nas contagens finais foi descrito anteriormente por outros autores com estudos conduzidos com bifidobactérias, nos quais eles concluíram que o fenômeno é devido ao fato que o dano experimentado pelas bactérias durante baixa tensão de pH é somente temporário, e não chega a matar as bactérias, o que permite que elas se recuperem quando passadas para um meio intestinal (Lacroix e Picot, 2004).

[000237] Em resumo, após o estudo no meio de simulador gástrico (2 horas), mais sobrevivências foram observadas quando as bactérias estavam encapsuladas em formulações Ap e Dp do que quando elas

estavam livres, ditas diferenças sendo significativas. Em contraste, essas diferenças não foram observadas nas formulações Bp e Cp. No entanto, após o fim do estudo (após 8 horas, após a passagem através do meio de simulador gástrico e então através do meio intestinal simulado), as diferenças foram maiores e significativas para todas as formulações de micropartículas (Ap, Bp, Cp e Dp), alcançando uma diferença de até três ciclos com respeito ao produto liofilizado.

[000238] Esses resultados demonstram que as micropartículas descritas significantemente aumentam a tolerância das bactérias estudadas a condições gastrointestinais simuladas.

[000239] Por outro lado, as micropartículas foram caracterizadas para avaliar seus estados durante o processo de degradação ao longo do tempo. Figura 6 permite-nos observar que as bactérias estão alojadas dentro das micropartículas e são liberadas ao meio quando ditas micropartículas se degradam ao longo do tempo.

#### EXEMPLO 4

##### **Preparação e caracterização de micropartículas de caseína ou de micropartículas de caseína e quitosano contendo bactérias probióticas encapsuladas do gênero *Lactobacillus casei***

[000240] Tipos diferentes de micropartículas contendo bactérias foram preparados, todos eles com caseína como o polímero base e quitosano. O método para preparar ditas micropartículas dependia do tipo de agente de reticulação usado.

##### **(ac) Micropartículas de caseína modificadas com quitosano na ausência de agente de reticulação**

[000241] 2 mL da suspensão bacteriana ( $2,2 \times 10^{10}$  CFU/mL) descrita na seção III dos “Métodos gerais” foram adicionados a 25 mL de uma solução aquosa a 10 mg/ml de caseinato de sódio, após terem sido centrifugados e resuspensores em uma solução de 2% sacarose (w/v). 10 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1,6 mg/mL



preparada em um meio aquoso com pH 5,5-6 por meio de adicionar 400 mg de quitosano a 250 ml de água purificada sob agitação e ajustar o pH com 0,1 N HCl, foram então adicionados à mistura. Após cinco minutos de incubação, 100 mg de manitol foram adicionados à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização.

As condições de processamento eram:

- [000242] - Temperatura de entrada de ar: 85°C
- [000243] - Temperatura de saída de ar: 40-45°C
- [000244] - Pressão de ar: 6 bar ( $6 \times 10^5$  Pa)
- [000245] - Taxa de bombeamento de amostra: 3,5 mL/min
- [000246] - Sucção: 100%
- [000247] - Fluxo de ar: 600 L/h

[000248] As micropartículas usadas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação. O mesmo estudo foi conduzido na ausência de bactérias para verificar como a presença desses probióticos afeta as características físicoquímicas das partículas.

#### (Bc) Micropartículas de caseína e quitosano na presença de sais de cálcio

[000249] 1,8 mL da suspensão bacteriana ( $9,4 \times 10^{10}$  CFU/mL) descrita na seção III dos “Métodos gerais” foram adicionados a 150 ml de uma solução aquosa a 10 mg/ml de caseinato de sódio, após terem sido centrifugados e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 25,5 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1,6 mg/mL preparada em um meio aquoso com pH 5,5-6 foram então adicionados à mistura. A mistura de sais de cálcio (12 ml de 2% acetato de cálcio w/v e 12 ml de 0.9% cloreto de cálcio w/v) foi adicionada a essa solução.

[000250] Após cinco minutos de incubação, 1,500 mg de manitol foi adicionado à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização. As condições de processamento eram as seguintes:

[000251] Temperatura de entrada de ar: 75°C

[000252] Temperatura de saída de ar: 38°C

[000253] Pressão de ar: 6 bar ( $6 \times 10^5$  Pa)

[000254] Taxa de bombeamento de amostra: 3.5 mL/min

[000255] Sucção: 100%

[000256] Fluxo de ar: 600 L/h

[000257] As micropartículas usadas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação.

(Cc) Micropartículas de caseína e quitosano reticuladas com vanilina

[000258] 0,5 mL de uma solução aquosa de vanilina (5 mg/mL) foram adicionados a 25 ml de uma solução aquosa a 10 mg/ml de caseinato de sódio. Após (pelo menos) 15 minutos de incubação, 3 mL da suspensão bacteriana ( $1.2 \times 10^9$  CFU/mL) descrita na seção III dos “Métodos gerais” foram adicionados à mistura, após terem sido centrifugados e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 10 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1,6 mg/mL preparada em um meio aquoso com pH 5,5-6 foram então adicionados à mistura.

[000259] Após cinco minutos de incubação, 200 mg de manitol foi adicionado à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização. As condições de processamento eram similares àquelas descritas na seção Bc.

[000260] As micropartículas usadas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação.

(Dc) Micropartículas de caseína e quitosano reticuladas com tripolifosfato

[000261] 1,2 mL da suspensão bacteriana ( $9.4 \times 10^{10}$  CFU/mL) descrito na seção III dos “Métodos gerais” foram adicionados a 100 ml de uma solução aquosa 10mg/mL de caseinato, após terem sido centrifugados e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 20 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1,6 mg/mL preparada em



um meio aquoso com pH 5,5-6 foram então adicionados à mistura. 1,6 mL de TPP (1 mg/ml) foram adicionados à mesma.

[000262] Após cinco minutos de incubação, 1,000 mg de manitol foi adicionado à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização. As condições de processamento eram similares às aquelas descritas na seção Bc.

[000263] As micropartículas usadas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação.

[000264] A tabela 2 resume as características físicoquímicas das micropartículas de caseína e quitosano contendo *L. casei* encapsulada, assim como os ciclos de morte bacteriana derivados do processo de produção de partícula.

**Tabela 2.** Características físicoquímicas das micropartículas de caseína e quitosano com *Lactobacillus casei* encapsulado.

Tipo de formulação	Contagem de bactérias antes da secagem por SD (CFU/g)	Contagem de bactérias após a secagem por SD (CFU/g)	Ciclos de morte bacteriana devido ao processo para obter as micropartículas (log CFU)
Bc	4,49 x 10 <sup>10</sup>	3,80 x 10 <sup>9</sup>	1,07
Cc	6,82 x 10 <sup>9</sup>	7,80 x 10 <sup>9</sup>	0,00
Dc	4,89 x 10 <sup>10</sup>	1,30 x 10 <sup>10</sup>	0,58

SD: Secagem por Atomização

[000265] O tamanho das micropartículas obtidas são similares em todos os casos abrangendo a faixa de 7±4 µm. Com relação ao processo de produção, os dados mostram que as formulações

desenvolvidas geralmente protegem *L. casei* melhor que *L. plantarum* ao longo do processo e Além disso, as formulações Cc e Dc são as que garantem melhor proteção.

[000266] Apesar de não haver um consenso a respeito da contagem mínima de probióticos viáveis por grama ou mililitro de produto, concentrações na ordem de  $10^7$ - $10^8$  CFU/mL (CFU/g) ao fim de sua vida de prateleira foram aceitas de maneira geral como o nível mínimo satisfatório. Também decidiu-se que os produtos probióticos devem ser consumidos regularmente em quantidades de cerca de 100 g/dia para que contagens de  $10^9$  CFU sejam liberadas no intestino (Karimi *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2011; Vinderola *et al.*, 2000a). Portanto, o método provido pela presente invenção pode ser considerado um método adequado, já que ele mantém a contagem bacteriana na ordem de  $10^9$  CFU/g (Tabela 2), o que permite que sua formulação em comidas com proporções na ordem de 1%, mantenham a concentração de bactérias probióticas necessária de  $10^7$  CFU/g, por exemplo.

[000267] A fim de conhecer a resistência gastrointestinal e viabilidade das bactérias encapsuladas durante o armazenamento, formulações Cc e Dc foram escolhidas já que elas proveram os melhores resultados de proteção e não requerem o uso de altas pressões, simplificando o processo de produção.

## EXEMPLO 5

### **Avaliação da estabilidade de *Lactobacillus casei* encapsulado ao longo do tempo de armazenamento sob condições ambientais**

[000268] Formulações Ac, Cc e Dc descritas no Exemplo 4 foram usadas para avaliar a sobrevivência das bactérias sob condições ambientais ao longo do tempo usando ambas suspensões frescas e produtos liofilizados como um controle comparativo. Figura 7 resume os resultados obtidos.



[000269] Os resultados mostram que no primeiro mês de estudo existe uma perda de 5 unidades logarítmicas nas contagens de bactérias frescas em suspensão, e no terceiro mês, perdas de 3 unidades logarítmicas foram observadas no caso de bactérias liofilizadas, perdas de 5 unidades logarítmicas foram observadas no quinto mês. No caso das bactérias que estão encapsuladas nas micropartículas de caseína e quitosano de acordo com as formulações Ac, Cc e Dc, as perdas após 3 meses são de cerca de 0,5 unidades logarítmicas, e após 6 meses são de 3 unidades logarítmicas para a formulação Ac, 2 unidades logarítmicas para a formulação Dc e de 1 unidade logarítmica para a formulação Cc.

[000270] Estes resultados confirmam que as formulações descritas na presente invenção permitem o aumento da viabilidade bacteriana sob condições ambientais a respeito das bactérias liofilizadas na maneira similar àquela observada no caso de *L. plantarum*.

#### EXEMPLO 6

##### **Avaliação a resistência das bactérias probióticas encapsuladas do gênero *Lactobacillus casei* ao meio gastrointestinal simulado**

[000271] Formulações Ac, Cc e Dc descritas no Exemplo foram usadas para avaliar a resistência das bactérias encapsuladas num meio gastrointestinal simulado seguindo o método descrito na seção VII dos "Métodos gerais". Figura 8 mostra os resultados obtidos ao longo do estudo para as micropartículas, assim como a resistência obtida para as bactérias liofilizadas não encapsuladas.

[000272] No caso das bactérias livres (bactérias liofilizadas não encapsuladas), o número de contagens viáveis diminuiu significativamente (4 unidades logarítmicas) nas duas primeiras horas de estudo no meio gástrico e foi mantido constante dali em diante. No entanto, os dados mostram que as bactérias encapsuladas são significativamente mais resistentes a tratamento no meio gástrico, alcançando o fim do tratamento com perdas médias de cerca de 1,5 unidades logarítmicas. Além disso, no

caso das formulações Ac e Cc, após a passagem através do meio intestinal, a resistência das bactérias diminuiu, apesar de ter continuado significativamente maior que o controle liofilizado, um efeito que não foi observado para a formulação Dc.

[000273] Esses resultados demonstram que as micropartículas descritas aumentam a tolerância das bactérias estudadas às condições gastrointestinais simuladas.

### EXEMPLO 7

#### **Estudo imunológico de biocápsulas de caseína associadas com *L. plantarum***

[000274] Para realizar este exemplo, micropartículas de caseína modificadas com quitosano na presença de vanilina descritas no Exemplo 1 (referência Bp) foram usadas. Para este fim, 0,5 mL de vanilina (5 mg/mL) foram adicionados a 25 mL de uma solução aquosa a 10 mg/ml de caseinato de sódio. Após (pelo menos) 15 minutos de incubação, 1 mL da suspensão bacteriana ( $4,6 \times 10^{10}$  CFU/mL) descrita na seção III dos "Métodos gerais" foi adicionado à mistura, após ter sido centrifugado e resuspenso em uma solução de 2% sacarose (w/v). 2 mL de uma solução de quitosano tendo uma concentração de 1,6 mg/mL preparada em um meio aquoso com pH 5,5-6 foram então adicionados à mistura.

[000275] 100 mg de manitol foram adicionadas depois de cinco minutos à mistura anterior e a formulação foi então seca usando a técnica de secagem por atomização. As condições de processamento eram as seguintes:

- [000276] - Temperatura de entrada de ar: 85°C
- [000277] - Temperatura de saída de ar: 40-45°C
- [000278] - Pressão de ar: 6 bar ( $6 \times 10^5$  Pa)
- [000279] - Taxa de bombeamento de amostra: 3.5 mL/mem
- [000280] - Sucção: 100%
- [000281] - Fluxo de ar: 600 L/h.



[000282] As micropartículas usadas na forma de pó foram novamente coletadas para caracterização e quantificação. O tamanho médio das micropartículas obtido foi  $7 \pm 4 \mu\text{m}$ . Por outro lado, a contagem de bactérias deu um teor de  $5,1 \times 10^{10}$  CFU por grama de micropartículas

[000283] Os estudos imunológicos foram conduzidos de acordo com as regulamentações do Comitê de Ética da Instituição assim como de acordo com a Legislação Europeia em animais experimentais (86/609/EU). Para este fim, 24 camundongos CD1 machos (Charles River) tendo um peso médio de 20 g foram usados, eles foram sujeitos a condições de iluminação normais (12 horas-12 horas). Os animais foram divididos em 4 grupos diferentes (6 camundongos por grupo) e cada grupo recebeu um tratamento diário diferente por 21 dias sucessivos.

[000284] 0,1 mL de PBS (salina de tampão fosfato pH 7,4) foi administrado oralmente ao primeiro grupo (controle). Um segundo grupo foi tratado com a suspensão de *Lactobacillus plantarum* em 2% sacarose com uma dose de  $10^7$  CFU/camundongo (LPs livres). O terceiro grupo foi tratado com uma mistura física na forma de suspensão formada por *L. plantarum* em 2% sacarose ( $10^7$  CFU/camundongo) misturada com micropartículas de caseína modificadas vazias com quitosano e reticuladas com vanilina (100  $\mu\text{g}$ /camundongo) (mistura física, MF). Finalmente, o quarto grupo recebeu a formulação de *L. plantarum* incorporada em micropartículas de caseína modificadas com quitosano e reticuladas com vanilina ( $10^7$  CFU/camundongo) (Bp) descritas anteriormente.

[000285] No dia 22, um volume de sangue de cerca de 250  $\mu\text{L}$  foi retirado usando tubos de separação de soro (Microtubo SARSTEDT 1,1 mL Z-Gel). Os animais foram então sacrificados e os baços foram extraídos, as células do baço foram desintegradas em meio RPMI 1640 com glicina a 4°C. Os eritrócitos foram lisados, com os esplenócitos contados, a concentração destes foi ajustada em meio RPMI completo. *L. plantarum* foi adicionado (numa razão de 10:1 a respeito dos esplenócitos) como um

estímulo para 100 µL de replicados de suspensão de célula. Após 48 horas de incubação a 37°C, as suspensões de células foram centrifugadas e o sobrenadante contendo as citocinas foram preservados a -80°C. As citocinas foram capturadas por meio do kit de citometria de arranjo de grânulo citométrico Th1/Th2/Th17 CBA (BD, USA) e determinadas usando um citômetro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer).

[000286] A Figura 9 mostra como a administração oral de *L. plantarum* (livre, encapsulado ou com mistura física) induz a um leve aumento no número de linfócitos citotóxicos que é manifestado pela redução na razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Este efeito é consistente com os dados descritos anteriormente na bibliografia correlacionando dito aumento com um efeito de colonização de intestino pelas bactérias [Herias *et al.*, 1999; Smelt *et al.*, 2012]. Por outro lado, observa-se que a encapsulação não afetou a capacidade das bactérias de alterar a razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

[000287] A Figura 10 mostra a razão de interferon-gama/interleucina-6 (IL-6) dependendo do tratamento recebido. Em todos os casos, a administração de *L. plantarum* aumento a síntese interferon-gama (IFN-g). No entanto, os animais tratados com a bactéria encapsulada nas micropartículas mostraram uma razão significativamente maior que aquela obtida com o resto dos tratamentos ( $p < 0.001$ ; ANOVA, *post hoc* Tukey). Esta mudança da resposta imunológica em relação a um perfil Th1 após a administração de *L. plantarum* é consistente com os resultados obtidos pelos outros autores [Smelt *et al.*, 2012; Wiese *et al.*, 2012].

### **REFERÊNCIAS**

- AYUB, M. A. Z. & BRINQUES, G. B. 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103, 123-128.
- BAO Y, ZHANG Y, ZHANG Y, LIU Y, WANG Y, DONG X, WANG Y, ZHANG H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus*



fermentum isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21 (5): 695-701.

BORGOGNA, M., BELLICH, B., ZORZIN, L., LAPASIN, R. & CESARO, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122, 416-423.

BURGAIN, J., GAIANI, C., LINDER, M. & SCHER, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.

DE VOS, P., FAAS, M. M., SPASOJEVIC, M. & SIKKEMA, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292-302.

DING, W. K. & SHAH, N. P. 2008. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. *International Food Research Journal*, 15, 219-232.

FERRANDINI, E., CASTILLO, M., LÓPEZ, M. B. & LAENCINA, J. 2006. Modelos estructurales de la micela de caseína. *An. Vet. (Murcia)*, 22, 5-18.

GBASSI, G. K., VANDAMME, T., ENNAHAR, S. & MARCHIONI, E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 103-105.

HEIDEBACH, T., FORST, P. & KULOZIK, U. 2009. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19, 77-84.

HEIDEBACH, T., FORST, P. & KULOZIK, U. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*, 98, 309-316.

HEIDEBACH, T., LEEB, E., FOERST, P. & KULOZIK, U. 2011. Microencapsulation of probiotic cells. In: MONZER FANUN, C.-P. (ed.) *Colloids in Biotechnology*.

HERIAS M.V., HESSLE C., TELEMO E., MIDTVEDT T., HANSON L.A., WOLD A.E., Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin Exp Immunol.* 1999 May; 116(2): 283–290.

HIDALGO et al. *Ars Pharm* 2008; 49 (3):245-257.

KARIMI, R., A. M. MORTAZAVIAN AND A. G. DA CRUZ. 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Sci Technol* 91:283–308

LACROIX, C. & PICOT, A. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515.

MATTILA-SANDHOLM, T. & SAARELA, M. (eds.) 2003. *Functional Dairy Products.*, Boca Raton: Woodhead Publishing Limited Abington Cambridge England CRC. Press LLC.

MOHAMMADI R., A. M. MORTAZAVIAN, R. KHOSROKHAVAR AND A.G. CRUZ. 2011. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Ann Microbiol* 61:411 424.

MOHAMMADI, R. AND MORTAZAVIAN A. M. 2011. Review Article: Technological Aspects of Prebiotics in Probiotic Fermented Milks. *Food Rev Int* 27:192–212.

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R. & SOHRABVANDI, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*, 5, 1-18.

OLIVEIRA, A. C., MORETTI, T. S., BOSCHINI, C., BALIERO, J. C., FREITAS, O. & FAVARO-TRINDADE, C. S. 2007. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24, 673-81.

PÉREZ-LUYO, A. 2008. Probióticos: Una alternativa en la prevención de la caries dental? . *Rev Estomatol Herediana*, 18, 65-68.



- SANDERS, M. E. 1999. Probiotics. Food Technology, 53, 67-77.
- SHAH, N. P., DONKOR, O. N., NILMINI, S. L. I., STOLIC, P. & VASILJEVIC, T. 2007. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. International Dairy Journal, 17, 657-665.
- SHAH, N. P. & LANKAPUTHRA, W. E. V. 1997. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. International Dairy Journal, 7, 349-356.
- SMELT MJ, DE HAAN BJ, BRON PA, VAN SWAM I, MEIJERINK M, et al. (2012) *L. plantarum*, *L. salivarius*, and *L. lactis* Attenuate Th2 Responses and Increase Treg Frequencies in Healthy Mice in a Strain Dependent Manner. PLoS ONE 7(10): e47244. doi:10.1371/journal.pone.0047244.
- VINDEROLA, C. G., W. PROSELLO, T. D. GHIBERTO AND J. A. REINHEIMER (2000a). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese. J Dairy Sci 83:1905–1911.
- VINDEROLA, C. G., & REINHEIMER, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36, 895–904.
- WIESE M., ELJASZEWICZ A., ANDRYSZCZYK M., GRONEK S., GACKOWSKA L., KUBISZEWSKA I., KASZEWSKI W., HELMIN-BASA A., JANUSZEWSKA M., MOTYL I., WIECZYNSKA J., MICCHALKIEWICZ, Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* and *Helicobacter pylori* CagA+ on the expression of selected superficial molecules on monocyte and lymphocyte and the synthesis of cytokines in whole blood culture. J Physiol. Pharmacol., 2012, 63, 3 217-224.

## REIVINDICAÇÕES

1. Micropartícula compreendendo uma matriz e uma bactéria probiótica, a dita matriz consistindo em caseína e quitosano, **caracterizada** pelo fato de que a razão em peso de quitosano:caseína é de 1:5-150 e um tamanho de partícula é compreendido entre 1 e 40  $\mu\text{m}$ .

2. Micropartícula, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de adicionalmente compreender um agente de reticulação.

3. Micropartícula, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a bactéria probiótica é uma bactéria do gênero *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus*.

4. Método para a obtenção de micropartículas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que compreende misturar caseína ou uma fonte de caseína, bactérias probióticas e quitosano.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que adicionalmente compreende adicionar um agente de reticulação.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de que adicionalmente compreende secar a suspensão contendo as micropartículas formadas.

7. Composição, **caracterizada** pelo fato de compreender uma pluralidade de micropartículas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo fato de ser selecionada a partir de:

uma composição A, compreendendo:

caseína, entre 40% e 60% em peso,

quitosano, entre 0,1% e 3,5% em peso,

bactérias probióticas, entre  $10^9$  CFU/g e  $5 \times 10^{12}$  CFU/g,

tripolifosfato de sódio, entre 0% e 0,15% em peso, e

agente protetor, entre 0% e 60% em peso;

em que as proporções em peso se referem ao peso total da composição;



uma composição B, compreendendo:

caseína, entre 40% e 60% em peso,  
quitosano, entre 0,1% e 3,5% em peso,  
bactérias probióticas, entre  $10^9$  CFU/g e  $5 \times 10^{12}$  CFU/g,  
vanilina, entre 0% e 0,6% em peso, e  
agente protetor, entre 0% e 60% em peso;

em que as proporções em peso se referem ao peso total da composição; e

uma composição C, compreendendo:

caseína, entre 40% e 60% em peso,  
quitosano, entre 0,1% e 3,5% em peso,  
bactérias probióticas, entre  $10^9$  CFU/g e  $5 \times 10^{12}$  CFU/g,  
 $\text{Ca}^{2+}$ , entre 0% e 10% em peso, e  
agente protetor, entre 0% e 60% em peso,

em que as proporções em peso se referem ao peso total da composição.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, **caracterizada** pelo fato de que as ditas micropartículas estão na forma de um pó seco.

10. Produto alimentar, farmacêutico, cosmecêutico ou nutracêutico compreendendo pelo menos uma micropartícula, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou uma composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 9, **caracterizado** pelo fato de que adicionalmente compreende um veículo alimentar, farmacêutico, cosmecêutico e nutracêutico aceitável, respectivamente.

11. Uso de uma micropartícula, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, uma composição, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 9, um produto, conforme definido na reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para ser usado oralmente na prevenção e/ou tratamento de uma deficiência ou patologia do sistema imunológico.

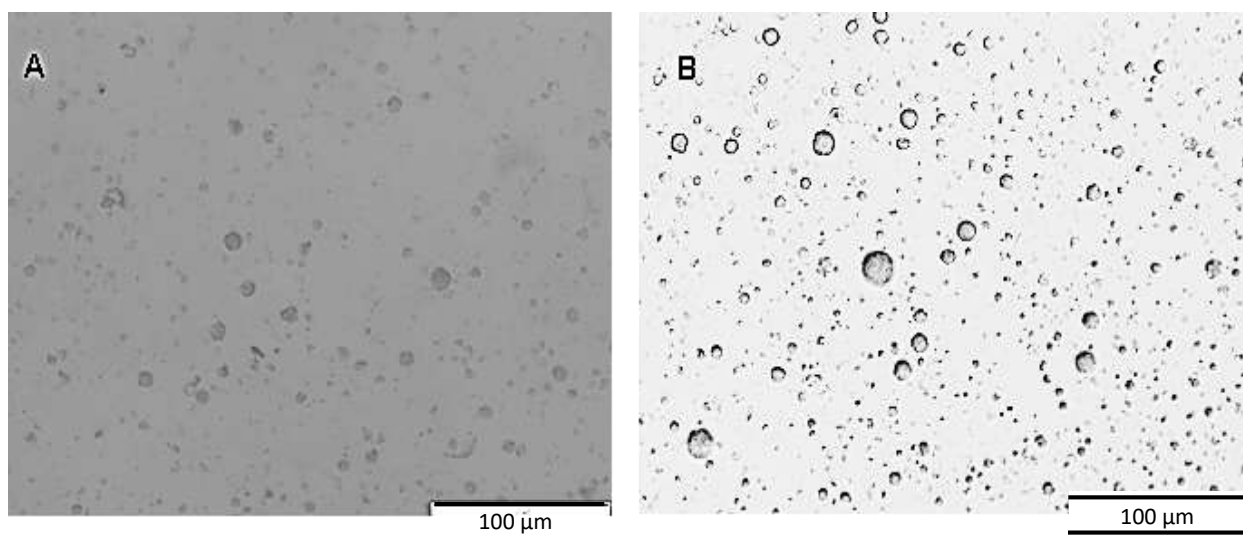
12. Uso de uma micropartícula, composição ou produto, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a deficiência ou patologia do

sistema imunológico é:

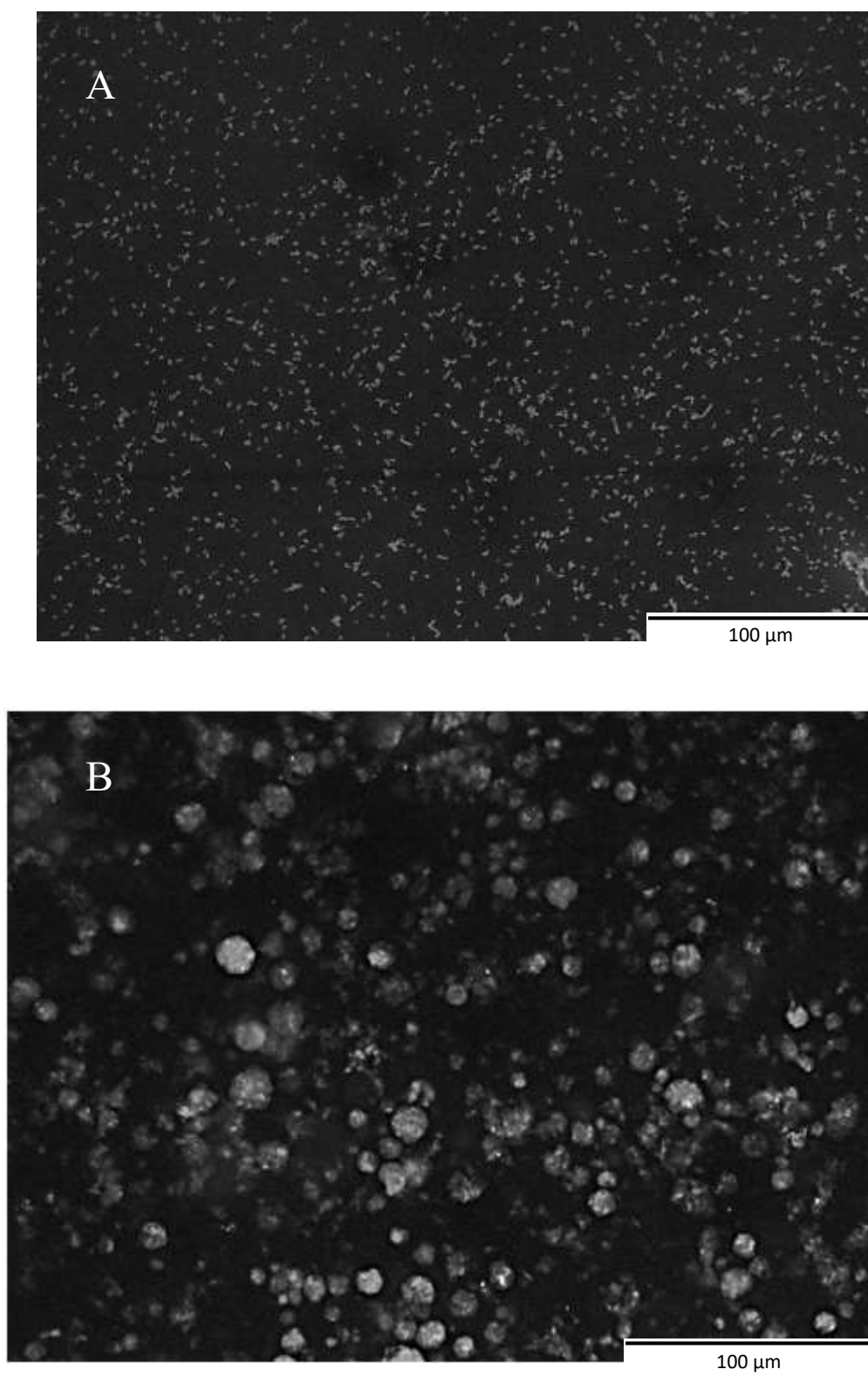
- Rejeição de transplante mediada por Th2,
- alergias e doenças associadas à alergia,
- imunodeficiências e patologias derivadas a partir das ditas imunodeficiências,
- infecções causadas por agentes patogênicos intracelulares, ou
- infecções das mucosas.

13. Uso de uma micropartícula, composição ou produto de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a deficiência ou patologia do sistema imunológico é uma infecção das mucosas.



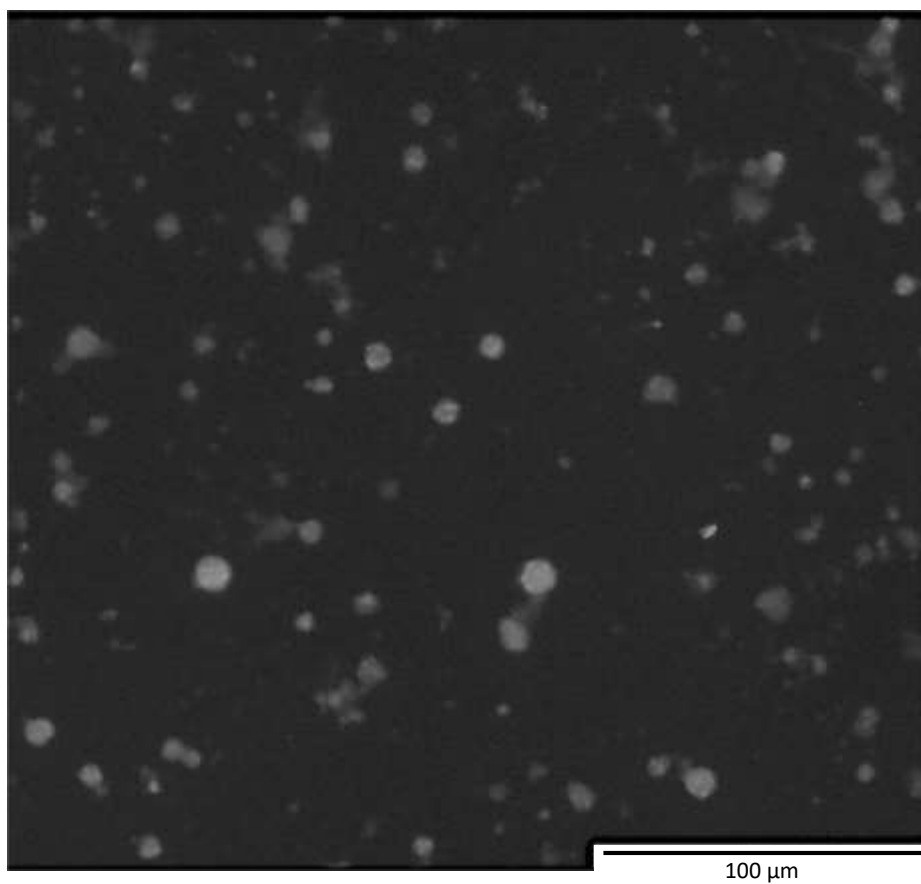


**Fig. 1**



**Fig. 2**





**Fig. 3**