



INPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
**Assinado
Digitalmente**

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

CARTA PATENTE Nº BR 102019025706-7

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

(21) Número do Depósito: BR 102019025706-7

(22) Data do Depósito: 05/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 15/06/2021

(51) Classificação Internacional: A01N 63/10; A01N 25/02; A01N 35/00.

(52) Classificação CPC: A01N 63/10; A01N 25/02; A01N 35/00.

(54) Título: SANITIZANTE HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS COM GLICINA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 20 ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: SILA MARY RODRIGUES FERREIRA; DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL; JULIANA DA SILVEIRA; MARCIA REGINA BEUX.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 05/12/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 31/12/2024

Assinado digitalmente por:
Alexandre Gomes Ciano

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

PATENTES
ICTs

SANITIZANTE HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS COM GLICINA

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção consiste uma solução sanitizante de hortaliças, composta de extrato de própolis com glicina ($C_2H_5NO_2$), de aplicação na área de alimentos, como alternativa de higienização menos agressiva ao ambiente e a saúde do homem, e mais eficaz na remoção de ovos de helmintos, uma vez que o hipoclorito de sódio ($NaClO$) não exerce essa função.

Fundamentos da Invenção, descrição do problema técnico e estado da arte

[002]. Diversos métodos físicos de higienização para alimentos, mais eficazes que os meios químicos, têm sido desenvolvidos, como o ultrassom, alta-pressão, radiação ultravioleta, radiação ionizante, plasma frio entre outros. Entretanto, esses são onerosos, e por isso ficam restringidos à indústria alimentícia (GERARD et al., 2019). Contudo, é conhecido que a maioria das DTA, no Brasil, ocorrem em nível domiciliar (BRASIL, 2018).

[003]. Nos domicílios, usualmente o hipoclorito de sódio ($NaClO$) é escolhido como meio de sanitização por ter baixo custo e ser relativamente eficaz em comparação a outros produtos saneantes disponíveis no mercado.

[004]. Entretanto, é conhecido que ovos de parasitos, presente em alimentos como em hortaliças podem permanecer viáveis e fixos a matriz vegetal mesmo após a higienização com substâncias cloradas (ADENUSI; ABIMBOLA; ADEWOGA, 2015; FALLAH; MAKHTUMI; PIRALI-KHEIRABADI, 2016; CARADONNA et al., 2017).

[005]. Além disso, tem sido reportado que as soluções cloradas geram subprodutos nocivos à saúde humana, como por exemplos trihalometanos, quando usadas de maneira incorreta (MEIRELES et al., 2016).

[006]. Sendo assim, os sanitizantes devem apresentar diferentes mecanismos de ação, como por exemplo efeito antimicrobiano para inativar os microrganismos como bactérias e fungos e, ação antiaderente para facilitar a remoção de ovos de parasitos dos alimentos. Além disso, devem ser menos agressivos ao meio ambiente e a saúde dos seres humanos.

[007]. Logo, uma alternativa de substância antimicrobiana menos agressiva ao ambiente e com efeito semelhante ao hipoclorito de sódio para a higienizar hortaliças, é a própolis e seus extratos (FÉAS et al., 2014; POBIEGA; KRASNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019). Esse produto proveniente das abelhas, apresenta propriedades bactericida, antifúngica e antioxidante, que estão relacionadas a diferentes compostos bioativos presente em sua composição (AHMAD et al., 2015; ANJUM et al., 2018).

[008]. Já uma forma mais eficaz de remover ovos de parasitos em hortaliças em comparação ao hipoclorito de sódio (NaClO), refere-se ao uso de glicina (1M, pH 5,5). Este aminoácido por ser apolar e possuir propriedades tensoativas interage com os ovos que podem estar fortemente aderidos à matriz vegetal, propiciando assim, sua remoção (COOK et al., 2006a; COOK et al., 2006b; ISO, 2016 MATOSINHOS et al., 2016).

[009]. Diante dessas considerações, quanto ao uso de cloro e a permanência de parasitos em hortaliças, desenvolve-se a presente invenção que compreende uma solução composta de solução

hidroalcoólica de própolis a 2% com glicina (1M) apresentando pH 5,5 que pode ser utilizada para reduzir microrganismos (bactérias e fungos) e remover ovos de helmintos em hortaliças.

Descrição detalhada da Invenção

Solução hidroalcoólica de própolis com glicina (SHP-glicina)

[010]. Para a elaboração da solução sanitizante a base de própolis e glicina, primeiramente foi elaborado o extrato de própolis, da abelha *Apis mellifera*, a partir da própolis cru, que atendia aos requisitos físico-químicos da legislação vigente (BRASIL, 2001).

[011]. A figura 1 – Demonstra os resultados físico-químicos apresentados pelo extrato de própolis, de acordo com o padrão de identidade e qualidade (BRASIL, 2001).

[012]. Posteriormente, a SHP-glicina foi preparada adicionando 15,01g de glicina e 18,14g de extrato etanólico de própolis (contendo 4g de extrato seco), em água destilada/estéril até completar 200 mL de solução final. Logo após, o pH da solução foi corrigido para 5,5.

[013]. Cabe destacar, que a glicina, é um produto comercial, no qual existem várias marcas disponíveis no mercado. A utilizada para os experimentos e na elaboração da SHP-glicina foi a da marca Dinâmica®. Entretanto, o principal requisito para o uso desse aminoácido na SHP-glicina é que o produto apresente concentração 1M, e em pH 5,5. A marca não é o principal determinante.

[014]. Em seguida, a ação antimicrobianas da SHP-glicina, mediante CIM (NCCLS, 2003), foi testada frente a cinco suspensões

microbianas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25023), *Escherichia coli* ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* ATCC 35152) e *Salmonella typhimurium* ATCC 117789 e *Candida albicans* ATCC 25023) padronizadas na escala 0,5 de Mc Farland.

[015]. A figura 2 – Demonstra a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da SHP-glicina (em porcentagem para o extrato de própolis e em molaridade para a glicina), em comparação as soluções controle composta pelo etanol a 4,95% (concentração presente na SHP-glicina) e solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm (concentração recomendada para higienizar hortaliças).

[016]. A atividade antimicrobiana, indicou que a formulação SHP-glicina composta por 2% de própolis e 1M de glicina é capaz de inibir o crescimento de todas as cepas microbianas testadas.

[017]. Além disso, para comprovar a ação antimicrobiana apenas da solução hidroalcoólica de própolis na concentração a 2% (SHP), e a não interferência da glicina na ação da própolis (Experimento microbiológico), folhas de alface foram lavadas durante 3 minutos em água corrente, e imersas em SHP, glicina e SHP-glicina, por 30 minutos, que em seguida foram submetidas a análise microbiológica.

[018]. A figura 3 – Representa o resultado do Experimento microbiológico, no qual foi avaliado o efeito da SHP e SHP-glicina na redução de microrganismos (aeróbios mesófilos e fungos totais) em folhas de alface, e a não interferência da glicina na ação da própolis. Folhas não higienizadas, folhas de alface apenas tratadas com água corrente e NaClO, foram utilizadas como controle. O resultado de todos tratamentos, feito em três repetições, e em triplicada, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Logo, para a

comparação das médias, letras iguais, na mesma coluna, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

[019]. O Experimento microbiológico, indicou que as alfaces tratadas com SHP e SHP-glicina obtiveram resultados semelhantes ao NaClO, apresentando contagens de aeróbios mesófilos e fungos totais abaixo de 5 e 4 log UFC/g (unidades formadoras de colônia por grama de alimento) respectivamente.

[020]. Em adição, para comprovar a ação eluente da glicina e SHP-glicina na remoção de helmintos em folhas de alface, e a não interferência da própolis na ação da glicina (Experimento parasitológico), folhas de alface foram contaminadas artificialmente com ovos de *A. suum*, e em seguida inseridas em sacos plásticos contendo SHP, glicina e SHP-glicina. Posteriormente o saco foi agitado manualmente, com movimentos de vai e vem durante 3 minutos, e em seguida o líquido resultante no saco de polietileno, foi submetido a contagem de número de ovos.

[021]. A figura 4 – Representa o resultado do Experimento parasitológico, no qual foi avaliado o efeito da glicina e SHP-glicina na remoção de helmintos em folhas de alface, e a não interferência da própolis na ação da glicina. Folhas de alface apenas tratadas com água potável foram utilizadas como controle. O resultado de todos tratamentos, feito em três repetições, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Logo, para a comparação das médias, letras iguais, na mesma coluna, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

[022]. O Experimento parasitológico, indicou que as soluções SHP-glicina e glicina removeram 33,22% e 41,96% (Figura 4) dos ovos de *A. suum* das folhas de alface, respectivamente, e não diferiram entre si.

Isso demonstrou que a própolis não interferiu na ação eluente da glicina.

[023]. Por fim, a partir dos resultados da atividade antimicrobiana (Figura 2), e do experimento microbiológico (Figura 3), e parasitológico (Figura 4). Desenvolveu-se o modo de higienização com a SHP-glicina, demonstrada a seguir.

Modo de higienização com a SHP-glicina

[024]. Para a higienização de hortaliça com SHP-glicina, deve ser utilizado o seguinte método:

[025]. 1. Lavar as hortaliças individualmente e ou folha por folha, mediante fricção, por 2 minutos em água potável corrente

[026]. 2. Inserir as folhas em embalagens de polietileno de primeiro uso (15 x 26 cm), contendo a solução SHP-glicina, na proporção de 1: 20 (hortaliça: solução sanitizante).

[027]. 3. Deixar as folhas e ou a hortaliça imersa na SHP-glicina, dentro do saco de polietileno, sob repouso durante 27 minutos.

[028]. 4. Agitar o saco, manualmente, com movimento de “vai e vem” durante 3 minutos.

[029]. 5. Descartar o líquido resultante no saco plástico, deixando apenas a hortaliça.

[030]. A figura 5 – Representa o resultado do experimento no qual foi avaliado o efeito da SHP-glicina na redução de microrganismos e remoção de ovos de helminto em hortaliça folhosa (Experimento microbiológico e parasitológico) em comparação a folhas não higienizadas e folhas tratadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a

200ppm. Os resultados de aeróbios mesófilos e fungos totais, feito em três repetições, em triplicada, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Já, os resultados % de ovos de remoção de *A. suum*, feitos em três repetições, foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Logo, para a comparação das médias, letras iguais, na mesma coluna, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

[031]. O resultado da análise microbiológica e parasitológica de folhas de hortaliça higienizadas com a SHP-glicina (Figura 5), conforme o método de uso (parágrafos 026 a 029), demonstrou que a redução de microrganismos (bactérias e fungos) foi semelhante ao hipoclorito de sódio (NaClO). Além disso, a SHP-glicina promoveu a redução de 2,5 vezes mais ovos de *Ascaris suum*, do que o hipoclorito de sódio.

[032]. Por fim, após em busca em banco de patentes foi identificada a existência de formulações antimicrobianas a base de própolis (FR3069413A1) ou contendo própolis como ingrediente auxiliar (CN107372807A, CN1374003A, KR101779127B1, CN109156520A, CN109007008A, CN102415437A, CN102232413A, CN109348896A, KR20160118545A, CN104970094A) para ser utilizada como conservante de hortaliças, com o intuito de preservar as características físicas e químicas, e ou para controlar doenças de plantas e microrganismos. Entretanto dessas patentes analisadas, em nenhuma delas reivindicam ou demonstram que a invenção permite a remoção de ovos de parasitos. Além disso, nenhuma delas são formuladas com extrato de própolis a 2% e glicina a 1M, e apresentam pH final de 5,5. Em adição, de todas as patentes pesquisadas em nenhuma delas o modo de uso, é semelhante ao apresentado pela glicina.

Referências

- [033]. ADENUSI, A.; ABIMBOLA, W.; ADEWOGA, T.; Human intestinal helminth contamination in pre-washed, fresh vegetables for sale in major markets in Ogun State, southwest Nigeria. **Food Control**, v. 50, p. 843-849, 2015.
- [034]. AHMAD, A.; KALEEM, M.; SHAFIQ, H.. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections. A review. **Food Research International**, v. 77, p. 221-235, 2015.
- [035]. ANJUM, S.I.; KHAN, K.A.; ATTUAULLAH, M.; KHAN, H.; ALI, H.; BASHIR, M.A.; ANSARI, M.J.; GHRAH, H.A.; ADGABA, N.; DASH, C.K.. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018
- [036]. BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Fevereiro de 2018. Apresentação em Power-point. Disponível em:
<<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 04 de julho de 2019.
- [037]. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 de janeiro de 2001.
- [038]. CARADONNA, T.; MARANGI, M.; CHIERICO, F.D.; FERRARI, N.; REDDEL, S.; BRACAGLIA, G.; NORMANNO, G.; PUTIGNANI, L.; GIANGASPERO, A.. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. **Food Microbiology**, v. 67, p. 67-75, 2017.

[039]. COOK^a, N.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V.. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 215-221, 2006.

[040]. COOK^b, N.; PATON, C. A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R. A. B.; BARKER, K.; SMITH, H. V.. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 2: validation. **International journal of food microbiology**, v. 109, n. 3, p. 222-228, 2006.

[041]. FALLAH, A.A.; MAKHTUMI, Y.; PIRALI-KHEIRABADI, K.. Seasonal study of parasitic contamination in fresh salad vegetables marketed in Shahrekord, Iran. **Food Control**, v. 60, p. 538-542, 2016.

[042]. FEÁS, X.; PACHECO, L.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L.M.. Use of Propolis in the Sanitization of Lettuce. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12243-12257, 2014.

[043]. ISO 18744:2016. Microbiology of the food chain - Detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits. London: British Standards Institution.

[044]. MATOSINHOS, F.C.; VALENZUELA, V.C.; SILVEIRA, J.A.; RABELO, E.M.. Standardization of a method for the detection of helminth eggs and larvae in lettuce. **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1827-1834, 2016.

[045]. MEIRELES, A.; GIAOURIS, E.; SIMOES, M.. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. **Food Research International**, v. 82, p. 71-85, 2016.

[046]. POBIEGA, K.; KRASNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M..
Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of
food quality – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p.
53-62, 2019.

REIVINDICAÇÕES

1. Sanitizante para hortaliças caracterizado por ser constituído pela combinação de própolis a 2% e glicina 1M, em solução hidroalcoólica com pH 5,5.

FIGURAS

Figura 1

Análise	Amostra	Padrão de identidade e qualidade (Brasil, 2001)
Extrato seco	22,10%	Mínimo de 11%
Cera	0,84%	Máximo de 1% do extrato seco
Atividade de oxidação	94,67%	**
Flavonoides totais	4,31%	Mínimo 0,25%
Fenólicos totais	10,92%	Mínimo de 0,50%

Figura 2

Microrganismos	NaClO (ppm)	SHP-Glicina (% - M)	Etanol (%)
<i>S. aureus</i>	200	0,5 - 0,25	Sem Efeito
<i>E. coli</i>	50	1 - 0,5	Sem Efeito
<i>S. typhimurium</i>	200	2 - 1	Sem Efeito
<i>L. monocytogenes</i>	200	1 - 0,5	Sem Efeito
<i>C. albicans</i>	200	1 - 0,5	Sem Efeito

Figura 3

Tratamentos	Aeróbios mesófilos (log UFC/g)	Fungos totais (log UFC/g)
Não higienizada	$7,1 \pm 0,16^a$	$5,8 \pm 0,23^a$
Água corrente	$5,9 \pm 0,10^b$	$4,8 \pm 0,09^b$
NaClO	$4,5 \pm 0,27^c$	$4,1 \pm 0,15^{cd}$
SHP	$4,7 \pm 0,10^c$	$3,6 \pm 0,19^c$
Glicina	$5,6 \pm 0,10^b$	$4,3 \pm 0,11^b$
SHP- glicina	$4,8 \pm 0,90^c$	$3,7 \pm 0,24^{cd}$

Figura 4

Tratamentos	% de ovos de <i>A. suum</i> removidos das folhas de alface
Não higienizada	-
Água potável	16,75 ($\pm 4,35$) ^a
Glicina	41,96 ($\pm 3,60$) ^b
SHP-glicina	33,22 ($\pm 7,25$) ^b

Figura 5

Tratamentos	Microrganismos expressos em log UFC/g				Helminto
	Aeróbios mesófilos		Fungos totais		% de ovos de <i>A.suum</i> removidos das folhas de alface
	Contagem	Redução	Contagem	Redução	
Não higienizada	7,6 ^a	-	6,0 ^a	-	-
NaClO	5,3 ^b	2,3	1,3 ^b	4,7	13,71 ^a
SHP-glicina	4,3 ^c	3,3	1,0 ^b	5,0	35,53 ^b