



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

(21) BR 10 2012 026425-0 A2

(22) Data de Depósito: 16/10/2012

(43) Data da Publicação: 30/09/2014

(RPI 2282)



(51) Int.Cl.:

A61K 36/9066

A61K 36/886

A61K 31/375

A61P 17/02

(54) Título: COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS

(73) Titular(es): Universidade Federal de Pernambuco

(72) Inventor(es): GLÍCIA MARIA TORRES CALAZANS
BRUNKEN, IVONE ANTÔNIA DE SOUZA, LUDHMILLA SUELEN
GOMES LINS DE LIMA, WAGNER EDUARDO DA SILVA

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO A BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS. A presente invenção refere-se ao processo de produção de uma composição curativa, à base de compostos bioativos e celulose bacteriana microcristalina. O processo de cicatrização proporcionado pela composição, verificado em cobaias (ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem wistar), mostrou-se satisfatório e superior a um padrão utilizado (membrana celulósica purificada estéril e livre de aditivos). Essa composição curativa apresentou-se de fácil aplicação, podendo ser nas formas de tecido artificial e pomada para uso médico, consistindo em barreira protetora para ferimento (bloqueio dos agentes patógenos), ao mesmo tempo em que libera gradativamente princípios ativos capazes de acelerar o processo de cicatrização, conferindo conforto ao paciente após sua aplicação, além de possuir grande resistência ao manuseio (no caso da membrana), podendo ser utilizada em grandes áreas de pele lesionada. Entre outros aspectos, a presente invenção refere-se a um produto eficaz para o tratamento de feridas. Como diferencial de produtos similares no mercado, este produto contém substâncias bioativas, favoráveis ao processo de cicatrização da pele lesionada, não consistindo nenhuma delas em antibióticos convencionais, os quais contribuem para o aumento das taxas de seleção natural, favorecendo o surgimento de linhagens microbianas resistentes aos mais diversos tipos de antibióticos propostos clinicamente.

“COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS”.

Campo de Invenção

A presente invenção, que se enquadra na área médica, refere-se a uma
5 composição curativa de fácil aplicação, podendo se apresentar sob as forma de
(i) tecido artificial e (ii) pomada; consistindo, em ambos os casos, em barreira
protetora para o ferimento (bloqueio de agentes patógenos), ao mesmo tempo
em que libera gradativamente princípios ativos capazes de acelerar o processo
de cicatrização, conferindo conforto ao paciente após sua aplicação, além de
10 possuir grande resistência ao manuseio (no caso da membrana), podendo ser
utilizada em grandes áreas de pele lesionada.

Sumário

A presente invenção destina-se ao tratamento de feridas e consiste em
composição curativa à base de celulose microcristalina, podendo se apresentar
15 como membrana ou pó (esteja sua granulometria em dimensões nanométricas
a milimétricas), e produtos bioativos, sendo esses últimos: (I) extrato de
cúrcuma (*Curcuma Longa*), o qual pode conter (curcumina,
demetoxicurcumina, bis-demetoxicurcumina e/ou ciclocurcumina); (II) *Aloe*
Vera; (III) prata reduzida; (IV) ácido ascórbico e/ou ascorbato de cálcio, (V)
20 cálcio (Ca^{2+} , podendo ser proveniente de qualquer sal com baixa toxicidade) e
(VI) alginato de sódio (podendo ser de baixa, média ou alta viscosidade). A
composição curativa (matriz promotora do crescimento celular com ação
cicatrizante) apresentou resultados satisfatórios, agindo como bloqueio

eficiente contra agentes patógenos, haja vista promissora aplicação para recuperação de área lesionada com grande perda tecidual sem utilização de enxerto ou sutura (cicatrização por segunda intenção).

Segundo experimentação animal, a qual utilizou como modelo animal ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* (da linhagem *Wistar*), verificou-se para um grupo de 15 animais com quadrantes de lesões cutâneas dorsais de 1,0 cm² (cada), um quadro de boa cicatrização e ausência de infecções ao longo de verificações em escalas temporais de 3, 5, 10 e 20 dias.

Anterioridades

O uso clínico de curativos encontra-se amplamente difundido no meio social, havendo uma enorme responsabilidade profissional, por parte dos médicos habilitados para prescrever o tratamento, uma vez que a escolha correta da terapêutica pode gerar um grande impacto sócio-econômico, no que se refere à cronificação de feridas e suas consequências, devido às infecções locais ou sistêmicas. Havendo esta última preocupação, diversos anti-sépticos e agentes antimicrobianos são imediatamente incrementados ao tratamento, o que não significa que haverá uma grande eficácia por contribuição desses aditivos, uma vez que drogas tópicas (como por exemplo: antibióticos, corticóides e antifúngicos) podem atrapalhar a migração epidérmica, interferindo negativamente na re-epitelização das feridas. Outro fator importante consiste em característica intrínseca de alguns curativos, os quais promovem o ressecamento drástico das feridas, para as quais estudos científicos vêm demonstrando que a umidade local melhora a taxa de re-epitelização.

Por definição, o material curativo destina-se à cobertura de uma ferida, com o objetivo de favorecer o processo de cicatrização, protegendo-a contra agressões externas, mantendo-a úmida e preservando a integridade de sua região periférica. Havendo a necessidade de atender a todas essas exigências, muitas vezes o curativo enquadra-se em uma faixa de terapêutica de alto custo, o que pode ser concomitante a alguns fatores de ineficácia já mencionados.

Ainda com relação aos materiais curativos habitualmente utilizados, os mesmos podem apresentar grande adesão ao novo tecido crescido, servindo de contato entre o novo tecido (emergente) e tecido desvitalizado (necrosado), o que durante a prática do desbridamento, remoção de tecido necrosado das feridas, poderá garantir ao paciente enorme desconforto (dor).

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

Uma das principais dificuldades encontradas pelos procedimentos e/ou materiais curativos convencionais tem sido o controle eficiente de processos infecciosos, ao mesmo tempo em que ativam ou possibilitam a ocorrência dos processos bioquímicos promotores da cicatrização. Este último argumento baseia-se na possibilidade de ocorrência de processos infecciosos severos, tais como sepsis, os quais podem ter sua origem a partir de feridas abertas infectadas, podendo ocasionar deformidades ou prejuízos organofuncionais. Muitos dos materiais curativos empregados atualmente não garantem o controle bacteriológico satisfatório, podendo permitir a difusão desses patógenos através de sua estrutura, bem como acomodá-los sob a sua

superfície, caso já estivessem presentes no local da lesão. Para este último caso, muitos procedimentos e/ou materiais são exigidos para que eliminem totalmente ou parcialmente a população desses agentes patógenos no local da ferida, conferindo enorme emprego de substâncias e procedimentos; o que

5 deve encarecer os custos da terapêutica, tanto para o portador da lesão quanto para a instituição que oferece cuidados clínicos. Para os casos convencionais de contaminação, sejam locais ou generalizados, os antibióticos consistem nos candidatos preferenciais, o que pode garantir uma boa margem percentual de reversão de quadro de infecção e consequente cura. Este último fato não

10 significa ausência de riscos ao paciente, uma vez que os antibióticos podem reverter à população de patógenos em uma nova, cujas características genéticas adquiridas garantem fatores de resistência aos mais diversos tipos de antibióticos de amplo espectro ou não. Outro fator que pode ser mencionado consiste na aplicação inadequada de agentes químicos ou até mesmo dos

15 antibióticos, os quais podem antagonizar com os agentes contribuidores e promotores da cicatrização.

Objetivos da Invenção

O objetivo da presente invenção é apresentar uma nova composição curativa destinada ao tratamento de feridas, possuindo este material clínico um

20 excelente desempenho cicatrizante e antimicrobiano, não havendo em sua composição qualquer metabólito, de origem microbiana, definido como antibiótico, o qual pode contribuir para o surgimento de linhagens bacterianas resistentes. Dessa forma, a presente invenção ao mesmo tempo em que

resolve o problema de recuperação de tecidos lesionados, inviabiliza o aumento das taxas dos processos de seleção natural desencadeados pelos antibióticos.

Solução

- 5 A presente invenção servindo como composição curativa, ou seja, ocupando áreas de tecidos lesionados, seja sob a forma de membrana (grandes extensões de lesões teciduais) ou de pomada (pequenas extensões de lesões teciduais), auxilia no processo de cicatrização servindo como matriz suporte para o crescimento celular, liberando gradativamente agentes favoráveis para o
- 10 mesmo. Adjunto aos agentes contribuidores da cicatrização, o curativo também possui em sua constituição agentes inibidores do crescimento microbiano, sem a presença de antibióticos, os quais poderão habilitar fatores de resistência às bactérias responsáveis pelas infecções.

Vantagens

- 15 Comparados aos resultados apresentados pelo curativo padrão adotado (membrana celulósica pura e livre de qualquer aditivo), a composição curativa contendo agentes bioativos apresentou alto poder cicatrizante, haja vista resultados de análise histopatológica, os quais serviram para avaliar a evolução cronológica da cicatrização, ao longo de 3, 5 e 10 dias para ambos os sistemas
- 20 (padrão e curativo proposto); sendo assim, o curativo proposto apresentou-se eficaz para o tratamento de feridas, uma vez que a partir do terceiro dia já se percebem: (a) uma redução do quadro de inflamação, (b) moderada (a pouca) presença de escaras, (c) acentuada presença de tecido de granulação e

neovascular, (d) acentuada fibroplasia e (e) satisfatório grau de epitelização. Estes últimos eventos citados, favoráveis à cicatrização, não acontecem para o grupo padrão – tratado apenas com a membrana livre de qualquer aditivo. Ainda com relação aos resultados histopatológicos, a composição curativa
5 proposta apresenta um acentuado favorecimento para o processo de cicatrização, evoluindo satisfatoriamente, para o quinto e décimo dia do tratamento, de forma a contornar tanto agentes externos, capazes de causar um quadro de infecção, quanto atende aos requisitos bioquímicos (no local da ferida) que favorecem o processo cicatricial e consequente desaparecimento
10 da lesão.

Com relação a um dos componentes presentes na composição curativa, (I) extrato de cúrcuma (*Curcuma Longa*), o mesmo foi submetido a ensaios antimicrobianos, para os quais foram utilizados microrganismos isolados de pacientes clínicos do Hospital das Clínicas da UFPE, conservados na Coleção
15 de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos - UFPE. Os microrganismos utilizados foram: *Pseudomonas aeruginosa* (DA 735-HC), *Staphylococcus aureus* (DA 613-HC) e *Acinetobacter spp* (DA 738-HC). A escolha desses microrganismos deveu-se a característica de multi-resistência que os mesmos apresentam aos mais diversos tipos de tratamento à base de
20 antibióticos (fenômeno MDR – *MultiDrug Resistance*), sendo frequentes as infecções nosocomiais ocasionadas pelos mesmos. O extrato de cúrcuma, submetido aos testes antimicrobianos frente a essas bactérias resistentes, apresentou-se eficiente cujas concentrações inibitórias (descrita em partes por

milhão - ppm) consistiram em, aproximadamente, 100 ppm para os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp*; e 500 ppm para o *Staphylococcus aureus*. Com base neste último ensaio antimicrobiano, sabe-se que o aditivo (extrato de cúrcuma) deverá garantir melhores condições de contorno para os casos de infecções das áreas lesionadas, evitando assim os casos mais severos de infecções generalizadas (sepsis).

Descrição Detalhada

Produção da membrana celulósica:

Utilizou-se uma cultura do microrganismo *Gluconacetobacter xylinus*, o qual foi inoculado em meio **Glicerol**, cuja composição consiste em (30g L⁻¹ de Glicerol; 16g L⁻¹ de extrato de levedura; 4g L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O; 3,5g L⁻¹ Ácido succinico e pH devendo ser ajustado entre 4,0 e 6,6, incluso os limites inferiores e exteriores) a 30°C por 10 dias. Após obtenção da biocelulose, a mesma foi lavada 7 vezes com água deionizada, seguindo para um procedimento de remoção de células o qual consistiu na utilização de solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹), durante 30 minutos em estufa a 80°C. Decorrido este último período, a matriz celulósica foi novamente submetida a processo de lavagem, agora com o intuito de remover o excesso de base, sendo utilizado para este fim a imersão em água deionizada a 50°C, com trocas constantes do banho a cada uma hora até que o pH da água utilizada para o banho atingisse pH 7,0 ao final de uma dessas etapas de banho. Por fim, utilizou-se a celulose congelada e úmida para compor a forma curativa de membrana; no caso da pomada, a celulose obtida foi liofilizada e moída.

Caracterização da celulose Produzida:

A celulose produzida foi caracterizada segundo espectroscopia na região do infravermelho, a qual possibilitou confirmação da presença dos grupos funcionais característicos desse tipo de material. Mediante utilização da

5 microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (*Energy Dispersive Spectroscopy* – EDS) tornaram evidentes a presença das fibras celulósicas características do material microcristalino obtido microbiologicamente, bem como a constituição característica, a nível atômico, para um polímero de carboidrato (polímero de unidades glicosídicas)

10 respectivamente. A difratometria de Raios X possibilitou a avaliação do grau de cristalinidade da celulose microbiana obtida.

Demais Componentes:

Exceto pela celulose microbiana obtida, descrito acima, e pelo tecido mucilaginoso da Aloe Vera, o qual foi extraído manualmente de amostras

15 vegetais lavadas inúmeras vezes com água potável, seguida de lavagem com água destilada com posterior aplicação de solução etanólica a 70%). O tecido mucilaginoso obtido foi devidamente acondicionado e resfriado em reservatório esterilizados. Os demais componentes foram obtidos comercialmente, não havendo qualquer processo de purificação.

20 Formulação:

(membrana)

De posse de membrana microbiana microcristalina úmida e tratada (livre de impurezas e células), com faixa média de massa de 5 a 20 g, a mesma foi

imersa em solução contendo AgNO_3 (com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 80 mmol L^{-1}), deixando por um período de 24 horas. Decorrido este período, a membrana foi removida, seca com papel de filtro e logo em seguida, imersa em banho contendo solução de ácido ascórbico (com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 200 mmol L^{-1}) durante 24 horas. Decorrido este período, o qual proporciona a formação de prata reduzida, a membrana foi lavada de 5 a 7 vezes com água deionizada (cada lavagem consiste em intervalos de 30 minutos); decorrida a última lavagem, a membrana é seca com papel de filtro, seguindo para uma nova imersão em solução contendo: (i) tecido mucilaginoso da *Aloe Vera* (com faixa de concentração abrangendo 0,01 a 10 g mL^{-1}); (ii) alginato de sódio, podendo ser de baixa, média ou alta viscosidade (com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 0,1 g mL^{-1}) e (iii) ácido ascórbico (com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 200 mMol L^{-1}) durante 24 horas. Logo após, a membrana foi seca com papel de filtro e imersa em solução contendo íons cálcio (Ca^{2+} , podendo ser proveniente de qualquer sal com baixa toxicidade e com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 100 mmol L^{-1}). Por último, a membrana, seca em papel de filtro, foi imersa em solução etanólica (etanol P.A) contendo extrato de cúrcuma (com faixa de concentração abrangendo 0,0001 a 1 g mL^{-1}) durante 24 horas.

20 (Pomada)

De posse de membrana microbiana ou pellets de celulose microcristalina, com faixa média de massa de 0,5 a 20 g, seca e moída (livre de impurezas e células e esteja sua granulometria em dimensões nanométricas a milimétricas), a

mesma foi imersa em solução contendo AgNO_3 (com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 80 mmol L^{-1}), deixando por um período de 5 horas. Decorrido este período, ao sistema contendo celulose e íons prata adicionou-se ácido ascórbico cuja faixa de concentração esteja abrangendo de 0,001 a 200 mmol L^{-1} ; deixando-se reagir durante 10 horas. Decorrido este período, o qual proporciona a formação de prata reduzida, a celulose foi lavada de 5 a 7 vezes com água deionizada (cada lavagem consiste em intervalos de 30 minutos); decorrida a última lavagem, a celulose filtrada, seguiu para uma nova imersão em solução contendo: (i) tecido mucilaginoso da *Aloe Vera* (com faixa de concentração abrangendo 0,01 a 10 g mL^{-1}); (ii) alginato de sódio, podendo ser de baixa, média ou alta viscosidade (com faixa de concentração suficiente para garantir gelificação da composição [solução de 0,01 a 10%]) e (iii) ácido ascórbico (com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 200 mmol L^{-1}); deixando-se o sistema sob vigorosa agitação durante 6 horas. Logo em seguida, adicionou-se ao sistema sob agitação mecânica, extrato de cúrcuma (com faixa de massa abrangendo 0,0001 a 1g). Por último, adicionou-se solução contendo íons cálcio (Ca^{2+} , podendo ser proveniente de qualquer sal com baixa toxicidade e com faixa de concentração abrangendo 0,001 a 100 mmol L^{-1}), até que houvesse gelificação do sistema.

20 Experimentação animal:

A membrana celulósica livre de qualquer aditivo, a qual se encontra disponível no mercado como curativo (membrana pura livre de aditivos), foi utilizada como padrão frente aos ensaios comparativos junto à nova composição proposta.

Para isso, analisaram-se os dados obtidos a partir da experimentação animal, cujo modelo animal utilizado foi o rato da espécie *Rattus norvegicus albinus* (da linhagem *Wistar*), com grupos de 15 animais com quadrantes de lesões cutâneas dorsais de 1,0 cm² (cada). Consistindo o grupo (a) **controle**, os
5 animais que receberam a membrana pura (livre de aditivos); e (b) **tratado**, animais que receberam as composições curativas.

Análise histopatológica:

Decorridas algumas etapas cronológicas do tratamento (3, 5 e 10 dias) das cobaias, tanto do grupo controle quanto tratado, foram retiradas algumas
10 amostras de pele (1,0 cm de margem de pele) em torno da lesão com profundidade até a derme. Cada amostra foi acondicionada em formol (10%).

Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina, bem como tricômico de *Masson* (coloração específica de colágeno). De cada ferida foram obtidas seis lâminas as quais foram avaliadas quanto a presença de vasos
15 sanguíneos na área da cicatrização, re-epitelização, proliferação de colágeno, presença de fibroblasto e leucócitos (mono e polimorfonucleares).

REIVINDICAÇÕES

1. “COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS” caracterizado por conter em sua
5 composição celulose microcristalina de origem microbiana, podendo esta última se encontrar nas formas de membrana ou pó (esteja sua granulometria em dimensões nanométricas a milimétricas).

2. “COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS” conforme reivindicação 1,
10 caracterizado pelo biomaterial (celulose microcristalina), nas suas diversas formas e tamanhos, servir de ingrediente adicional para uma composição curativa, aplicada ao tratamento de feridas, cujos demais constituintes consistem em: (I) extrato de cúrcuma (*Curcuma Longa*), o qual pode conter (curcumina, demetoxicurcumina, bis-demetoxicurcumina e/ou ciclocurcumina);
15 (II) *Aloe Vera*; (III) prata reduzida; (IV) ácido ascórbico e/ou ascorbato de cálcio, (V) cálcio (Ca^{2+} , podendo ser proveniente de qualquer sal com baixa toxicidade) e (VI) alginato de sódio (podendo ser de baixa, média ou alta viscosidade).

3. “COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS
20 PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS” conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser apresentado sob a forma de membrana celulósica incrementada dos demais aditivos já mencionados, podendo ser indicado e aplicado dessa forma para o tratamento de feridas (lesões) com grande extensão (área).

25 4. "COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS
PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS" conforme reivindicações 1 e 2,
caracterizado por ser apresentado sob a forma de pomada, podendo ser
indicado e aplicado para o tratamento de feridas com pequenas extensões.

5. "COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS
30 PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS" conforme reivindicações 1, 2 e 4,
caracterizados pelo produto (composição curativa) consistir em uma pomada,
ou seja, a celulose microcristalina de origem microbiana encontra-se sob a
forma de pó incrementado dos demais aditivos já mencionados, constituindo
assim o produto final.

35 6. "COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS
PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS" conforme reivindicações 1, 2, 4 e 5,
caracterizado pelo pó obtido da celulose microcristalina poder se apresentar
em uma faixa de granulometria desde dimensões nanométricas a milimétricas.

7. "COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS
40 PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS" conforme reivindicações 1, 2, 4, 5 e 6,
caracterizado pelo produto final apresentado sob a forma de pomada servir
como base colante (adesiva) da membrana celulósica (livre de qualquer aditivo)
e/ou membrana incrementada com os mesmos aditivos da pomada. Podendo
esta base adesiva ser empregada em contato direto com a pele e/ou entre
45 membranas.

RESUMO

“COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS”

5 A presente invenção refere-se ao processo de produção de uma composição curativa, à base de compostos bioativos e celulose bacteriana microcristalina. O processo de cicatrização proporcionado pela composição, verificado em cobaias (ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem *Wistar*), mostrou-se satisfatório e superior a um padrão utilizado (membrana celulósica purificada estéril e livre de aditivos). Essa composição curativa apresentou-se de fácil aplicação, podendo ser nas formas de tecido artificial e pomada para uso médico, consistindo em barreira protetora para o ferimento (bloqueio dos agentes patógenos), ao mesmo tempo em que libera gradativamente princípios ativos capazes de acelerar o processo de cicatrização, conferindo conforto ao

10 paciente após sua aplicação, além de possuir grande resistência ao manuseio (no caso da membrana), podendo ser utilizada em grandes áreas de pele lesionada. Entre outros aspectos, a presente invenção refere-se a um produto eficaz para o tratamento de feridas. Como diferencial de produtos similares no mercado, este produto contém substâncias bioativas, favoráveis ao processo

15 de cicatrização da pele lesionada, não consistindo nenhuma delas em antibióticos convencionais, os quais contribuem para o aumento das taxas de seleção natural, favorecendo o surgimento de linhagens microbianas resistentes aos mais diversos tipos de antibióticos propostos clinicamente.

20