



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

(21) BR 102018077165-5 A2



(22) Data do Depósito: 26/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/07/2020

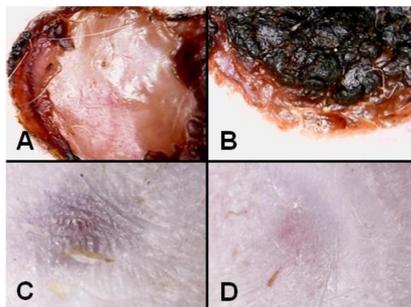
(54) **Título:** PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/48; A61K 131/00; A61P 17/02; A61P 31/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** EULINA TEREZA NERY FARIAS; FABRICIO BEZERRA DE SA; JOAQUIM EVENCIO NETO; GEORGE CHAVES JIMENEZ; RINALDO APARECIDO MOTA; CAROLINA JONES FERREIRA LIMA DA SILVA; LIGIA REIS DE MOURA ESTEVAO; JOSE FERREIRA DA SILVA NETO; IVONE ANTONIA DE SOUZA; MARCIA SILVA NASCIMENTO; TERESINHA GONCALVES DA SILVA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA.

(57) **Resumo:** PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA. A presente patente de invenção trata de um creme fitoterápico, não tóxico, de uso tópico, elaborada a partir de extrato exclusivamente vegetal de uma mistura de frutos e sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) e veículo orgânico, nas concentrações entre 9 a 10%, testada em modelo de cicatrização em ratos albinos. O que lhe conferiu ação aceleradora de processo de cicatrização de lesões cutâneas induzidas, reduzindo o tempo de reepitelização das mesmas, bem como, ação antibacteriana *in vitro* avaliada pela técnica de difusão em meio sólido de poço, frente amostras de *Staphylococcus* spp. poderá ser utilizado na cicatrização de feridas, como também no tratamento complementar na clínica médica veterinária, uma vez que apresenta atividade cicatrizante e antibacteriana quando administrado topicamente.



“PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE
PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA”

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se a uma formulação fitoterápica, não tóxica, elaborada com extrato hidroalcólico de frutos e sementes de Pau-Ferro (*Caesalpinia ferrea*) a ser utilizada como cicatrizante e antibacteriano de uso tópico, em feridas cutâneas. O produto fitoterápico poderá ser utilizado na cicatrização de feridas, como também no tratamento complementar na clínica médica veterinária, uma vez que apresenta atividade cicatrizante e antibacteriana quando administrado topicamente.

Antecedentes da Invenção

[002] Para o tratamento de lesões cutâneas, algumas pesquisas têm demonstrado que muitos métodos tradicionais utilizados para acelerá-la os processos de cicatrização de feridas têm demonstrado bons resultados (HADDAD, et al., Rev. Bras. Enferm. 36(2): 152-163, 1983), como é o caso das plantas medicinais (fitoterápicos) que podem ser usadas como protocolo principal ou complemento terapêutico (OLIVEIRA JUNIOR, Efeitos do uso tópico de óleo de semente de girassol (*helianthus annus*) em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em equinos, 2010 (Pós-Graduação em Ciência Animal). Há estudos que também investigam o uso de plantas com ação nematocida e antimicrobiana, sendo assim uma área promissora para pesquisa (ROCHFORTS, et al., Phytochem. 69: 299-322, 2008).

[003] Dentre essas espécies medicinais temos *Caesalpinia ferrea* Mart. também conhecida pela sinonímia de *Libidibia ferrea*, e vulgarmente como pau-ferro ou jucá. *C. ferrea* é uma árvore leguminosa nativa do Brasil e amplamente distribuída principalmente no Norte e Nordeste (FRASSON et al., Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. Rer. Bras. Farmacog. V.13, n.1, p.35-39, 2003). É uma planta muito empregada na etnomedicina e na etnoveterinária em processos cicatriciais de feridas cutâneas (XIMENES, N. C. A. Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem da *Caesalpinia ferrea* (CfePL): aplicação biológica, 2004. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Ciências Biológicas); MONTEIRO et al., Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó

Island, Eastern Amazonia, Brazil.,Acta Amaz., v. 41, n. 2, p. 233-242, 2011) e também como antimicrobiano natural (TOMAZ et al. Acta Scientiae Veterinariae. 41: 1-7, 2013).

[004] Diante desse contexto a nossa pesquisa está em sintonia às ações previstas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, em que se destacam: a garantia do monitoramento da qualidade dos fitoterápicos; o incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país, no que se refere a pesquisa com plantas nativas, promoção do uso racional de plantas medicinais e dos fitoterápicos no SUS; e ainda o acompanhamento e avaliação da inserção e implementação das plantas medicinais, e fitoterapia no referido programa de saúde (PICKER,T.B. Ensaio pré-clínicos da exposição materna à *Caesalpinia ferrea*, 2015.Dissertação de Mestrado(Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Tais requerimentos tornam-se importante em países como o Brasil, onde a maioria das espécies vegetais de valor medicinal ainda não foi estudada, especialmente as nativas encontradas nos diferentes ecossistemas brasileiro. (GONZALEZ,F.G. Estudo Farmacognóstico e Farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Matius. 2005, Tese de Doutorado (Pós-Graduação em FÁRMACOS e Medicamentos).

[005] O estado da técnica já apresenta documentos de patentes como PI0705224-3, BRP10705224 e PJP 2006342078, que descreve o uso do extrato de pau ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart.) em formulações cosméticas e farmacêuticas como agente despigmentante/clareador da pele, e solução utilizada em medicamentos, bebidas e cosméticos para prevenir e/ou tratar doenças alérgicas. Os documentos diferem da presente invenção por apresentar formulações contendo extratos associados a outras espécies medicinais o que muda suas propriedades farmacológicas.

[006] O documento BR1020140039457 descreve obtenção de extrato hidroetanólico padronizado por decocção, na preparação de formulações farmacêuticas sólidas (cápsulas, comprimidos, drágeas e similares), semissólidas (cremes, géis, pastas, pomadas e similares), nanoparticuladas e líquidas (elixires, emulsões, extratos, injetáveis, soluções, suspensões, tinturas, xaropes e similares), com atividade terapêutica. O documento difere da presente invenção por utilizar extrato obtido da de uma parte diferente da planta o que pode mudar os compostos bioativos presentes na formulação final e a forma de extração destes compostos.

[007] O documento PI 0506067-2, descreve o valor nutricional do pau-ferro como fonte de sulfato ferroso para suplementação alimentar e combate a anemia humana e animal. O documento

difere da presente invenção por apresentar não se caracterizar como um creme fitoterápico com propriedades cicatrizantes e antibacterianas.

[008] No Formulário de Fitoterápicos (Formulário de Fitoterápicos, 1ª edição, 2011, Farmacopeia Brasileira), está descrita uma formulação fitoterápica de uso tópico com indicação cicatrizante e antisséptica. O documento difere da presente invenção por ter sido elaborado na forma de gel, por utilizar extrato glicólico na concentração de 5% (v/v), tendo apenas os frutos como matéria prima.

[009] No artigo intitulado “Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar” (KOBAYASHI, et al., Braz. J. Vet. Res An. Sci., v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015) os autores avaliaram a ação cicatrizante do pau-ferro. O documento difere da presente invenção, por não apresentar produto na forma de creme fitoterápico com propriedades cicatrizantes e antibacterianas.

[010] O artigo intitulado “Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos” (OLIVEIRA, et al., 2010, Rev. Bras. Plantas Med. Botucatu, v.12, n.3, p.302-310). Os autores avaliaram a ação cicatrizante do pau-ferro em feridas. O documento difere da presente invenção por utilizar uma pomada elaborada com o pó da casca da planta, conseqüentemente, uma parte diferente da planta, o que pode mudar os compostos bioativos presentes na formulação final e a forma de extração destes compostos.

[011] O artigo intitulado “Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius,” (GONZALEZ, F. G., 2005) (Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos). A autora ao avaliar a ação cicatrizante dos extratos etanólicos bruto liofilizado das partes de caule e folhas da planta, não obteve resultados. No presente pedido de patente são usados fruto e semente com comprovada atividade biológica.

[012] No que se refere a atividade antimicrobiana, os artigos intitulados “Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico do fruto da *Caesalpinia ferrea* Mart. frente a bactérias causadoras de mastite bovina” (TOMAZ et al., Acta Scientiae Veterinariae, v.41,p.1-7, 2013); “Perfil de extratos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina” (PEREIRA et al., Rev. Biofar., n.3, v.1, p.105-111,2009) e “Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae” (CAVALHEIRO, et al., Rev. Bras. Farmacog. v.19, n.2, p.586-591,2009), avaliaram a ação antimicrobiana de C.

ferrea frente a diferentes microrganismos patógenos. O documento difere da presente invenção por utilizar apenas extratos, não apresentar um produto na forma de creme a partir de extrato hidroalcoólico de fruto e semente.

[013] Diante do observado no estado da técnica, os elementos que compõem a presente invenção se apresentam como novos sendo passíveis de proteção.

Descrição da Invenção

[014] Amostras de *Caesalpinia ferrea* foram previamente identificadas por especialista e posterior depósito e registro em herbário. A espécie foi identificada como *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae, e a exsicata incorporada ao Herbário da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de registro #69.656.

[015] Na primeira modalidade, é descrito o processo de obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (etanol/água). O método de extração usado na presente invenção compreende a maceração e extração por solvente a frio. O extrato foi preparado a partir de frutos e sementes secos, triturados e acondicionadas em extrator, no qual foi adicionado volume de solvente suficiente para a homogeneização da mistura, e completa imersão no solvente. A mistura foi mantida no extrator por um período preferencial de 72 horas, sendo posteriormente filtrada e submetida preferencialmente a um evaporador rotatório sob pressão reduzida, levemente aquecida entre 30-45 °C, mas preferencialmente 45 °C sob agitação, preferencialmente, a 120 rotações por minuto (RPM).

[016] Na segunda modalidade é descrito o processo de obtenção de um creme fitoterápico de uso tópico. Os frutos e semente foram desidratados, a fim de se obter o material seco, que foi pulverizado. A matéria prima foi adicionada ao solvente hidroalcoólico composto preferencialmente por água destilada e álcool etílico (PA), sendo o extrato obtido por maceração a frio. A solução foi filtrada e concentrada à temperatura preferencial de 25-30 °C, até a evaporação do solvente. Após a evaporação, obteve-se um extrato bruto na concentração de 170 mg/mL de sólidos totais. O creme foi elaborado, tomando-se uma massa desse extrato, que foi incorporado à lanolina anidra pura (veículo) na concentração final de 9 a 10% de extrato, preferencialmente 9,3% (p/p) ou 9 partes de lanolina para 1 parte de extrato. É importante assinalar que a lanolina anidra pura (LAP) foi escolhida como veículo, por ser um composto lipofílico, obtida da lã de ovelhas (*Ovis aries*), utilizada como

veículo em algumas preparações farmacológicas para tratamento de feridas, devido a sua propriedade oclusiva, de penetração e manutenção da hidratação da pele. Ela é composta por uma mistura de ésteres e poliésteres de álcoois de cadeia longa e por ácidos graxos, com predominância dos insaturados, representados por uma proporção elevada dos ácidos eicosapentaenóico (EPA), linoléico e docosa-hexaenóico. Os polietilenoglicóis (PEG) são substâncias que apresentam características tipicamente hidrófilas, sendo utilizados em formulações hidrossolúveis, pois são excelentes emulsivos de óleo em água (GELINSK, T.C. 2016). Os exemplos a seguir apresentam resultados para uma melhor compreensão da caracterização e aplicação industrial da presente invenção.

Exemplo 1. Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico

[017] Após a obtenção do extrato hidroalcoólico bruto. Os ensaios fitoquímicos foram realizados segundo metodologia descrita em Costa (COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1985) considerando-se como parâmetros, grupos de metabólicos secundários relevantes, como: taninos através da reação de cloreto férrico a 2%, flavonoides através do teste de Shinoda, alcaloides através da reação de Dragendorff e Mayer, terpenos e esteroides pela reação de Liebermann-Buchard e saponina pelo índice de espuma. Na avaliação fitoquímica do extrato hidroalcoólico bruto de *C. ferrea*, foi possível constatar a presença dos compostos fenólicos tanino hidrolisáveis e flavonoides.

Exemplo 2. Citotoxicidade do extrato hidroalcoólico

[018] A análise da citotoxicidade foi realizada pelo método MTT, que é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (BERRIDGE, M.V. et al. Biochemical. 4: 14-19, 1996). As linhagens tumorais utilizadas foram HT29 (carcinoma de colón-humano), HEP (carcinoma de laringe-humano) e NCI h-292 (Câncer de pulmão-humano) cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril e testadas na concentração de 25 µg/mL para substâncias puras. Nos ensaios de

citotoxicidade *in vitro*, o extrato da presente invenção demonstrou baixa atividade citotóxica nas concentrações testadas.

Exemplo 3. Teste de toxicidade aguda do extrato hidroalcolico em modelo animal

[019] Todas as atividades realizadas nesta etapa da pesquisa foram desenvolvidas em concordância com as normas vigentes para uso de animais e experimentação, sendo os protocolos experimentais analisados e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, licença Nº 433/12. Os Testes de Toxicidade Aguda e Dose Letal Média (DL₅₀) foram realizados simultaneamente. O experimento foi conduzido, utilizando-se 48 camundongos swiss (*Mus musculus*) albino, machos, com peso entre 25 a 35 g, onde foram mantidos em biotério, a temperatura ambiente (27 ± 5 °C) com água potável e ração a vontade. Os animais foram separados em grupos de seis por tratamento, onde eram mantidos em jejum prévio de 12h antes dos ensaios. Em cada grupo os animais receberam extrato hidroalcolico bruto de *C. ferrea* resuspendido em solução salina (NaCl 0,9%), pela via intraperitoneal (IP), com dose inicial de 3 mg Kg⁻¹ ml⁻¹ de peso, em expansão logarítmica. Após administração, os animais de cada grupo eram colocados em campo aberto onde eram observadas as reações comportamentais e orgânicas conforme a dose administrada, por período de 30 minutos, tomando-se como base os descritores disponíveis nos trabalhos de Malone (Ethnopharmacol. 8: 127 -147, 1983) e Almeida (ALMEIDA, R. N. Triagem farmacológica comportamental, em Psicofarmacologia, Fundamentos Práticos. Guanabara Koogan S. A. 2006). Em seguida, os animais ainda ficavam sob observação por até 48h. De pose dos dados obtidos, foi calculada a DL₅₀ pelo método dos probitos mediante sistema de regressão linear.

[020] No que se refere à toxicidade aguda, a realização dos bioensaios de atividade espontânea, permitiu a verificação de 37 respostas comportamentais associadas às manifestações clinicas específicas. Desse total 40,54% eram do tipo estimulante sobre o sistema nervoso central (SNC), e 10,81% eram do tipo depressor. 24,32% estavam associadas à atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) e um percentual de 24,32% de respostas que não se enquadraram nos descritores utilizados como referência.

[021] De maneira geral, o extrato apresentou uma característica de resposta biológica predominantemente excitatória sobre o sistema nervoso central. A dose mínima

foi obtida na concentração de 84.375 mg/Kg, e a $DL_{50}=540,75$ mg/Kg, dose considerada moderadamente tóxica (LOOMIS, T.A. Fundamentos de toxicologia, Espanha: Acribia,1974)

Exemplo 4. Teste de cicatrização *in vivo* com o creme fitoterápico

[022] No ensaio para avaliar a ação cicatrizante "*in vivo*" do composto foram utilizados 52 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus) machos de 90 dias de idade, que foram acondicionados em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura de 23 a 25 °C, umidade relativa do ar acima de 70%, e ciclo de luminosidade claro/escuro de 12 x 12 horas; recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em três subgrupos: G1(20) animais tratados com o creme, G2 (20) grupo controle, animais tratados com lanolina e G3 (12) grupo controle absoluto animais sem nenhum tratamento. Para a confecção das feridas, os animais foram submetidos à anestesia dissociativa utilizando cloridrato de quetamina na dose de 75 mg/Kg e xilazina na dose de 5mg/Kg por via intramuscular (i.m.). Após atingirem plano anestésico, os animais foram tricotomizados, sendo a antisepsia do local cirúrgico efetuada com álcool a 70%(etanol/água) Em seguida foram retirados da região dorsolombar quatro fragmentos de pele, com o auxílio de Punch metálico. Logo após a injúria tecidual, o creme foi aplicado com auxílio de uma seringa de 1 mL e a lanolina com espátulas de madeira individuais e estéreis e, posteriormente, uma vez ao dia, até a eutanásia pré-estabelecida para cada grupo.

[023] Todas as feridas foram avaliadas clinicamente quanto à coloração do leito da ferida, presença de crostas, exsudação e prurido, diariamente, e nos períodos estabelecidos de pós-operatório. A mensuração do diâmetro maior e menor das feridas era efetuada a cada 72 horas, empregando-se paquímetro digital milimetrado (King Tools). Na avaliação morfométrica, para a obtenção da área das feridas, utilizou-se a equação formulada por Prata et al. (1988) $A = \pi \cdot R \cdot r$, descrita no artigo "Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em ratos", publicado na Acta Cir. Bras., v. 3, n. 2, p. 43-48, na qual A representa a área (cm²); R, o raio maior e r, o raio menor. O grau de contração expresso em termos percentuais foi mensurado pela equação proposta por Ramsey et al. (Am. J. Vet. Res. 56(7): 941-949, 1995), $G_c (\%) = 100 \times (W_o - W_i) / W_o$. Onde W_o é o valor da área inicial da ferida e W_i o valor da área da ferida no dia da eutanásia.

[024] Decorridos os períodos pré-estabelecidos de 3º, 7º, 14º e 21º dias de pós-operatório, foram realizadas coletas de material para avaliações histopatológica das feridas. Os animais foram anestesiados para retirada dos fragmentos de pele através de incisão abrangendo pele íntegra e área da lesão. As feridas de todos os grupos foram fixadas em solução de formalina a 10% e submetidos à inclusão em parafina, para seguida confecção das lâminas histológicas pela técnica rotineira em parafina e coloração em Hematoxilina/Eosina (H.E). Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa hepática, e imediatamente transferido para dois tubos, um contendo anticoagulante EDTA (Ácido etilenodiaminotetrácetico) e outro sem anticoagulante. Foram feitas análise bioquímica e hematológica. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram glicose, ureia, fosfatase alcalina (FAL), aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (AST) e creatinina.

[025] Após a coleta de sangue os ratos foram eutanasiados por aprofundamento anestésico por sobre dose de tiopental de 100mg/Kg (i.p.) (DIRECTIVE, 2010. The European Parliament and of The Council on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union, 276/33-79). Esse experimento foi conduzido de acordo com as normas de pesquisa científicas com animais, sendo o protocolo experimental analisado e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, licença Nº 126/2016.

[026] Delineamento e análise estatística dos resultados foram expressos em termos de média e desvio padrão, e a condição de normalidade da distribuição dos valores avaliados pelo método de Shapiro- Wilks, considerando-se como valor descritivo um valor de $p < 0,05$. Os dados com distribuição normal foram analisados por meio da ANOVA e teste de post. Hoc. De Tukey. Aqueles com distribuição não paramétrica foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e post. hoc. de Dunn considerando-se um nível descritivo de $p < 0,05$.

[027] Na análise macroscópica, as feridas dos animais do grupo tratado (G1) já no 3º dia do pós-operatório, apresentaram, leve hiperemia e estágio inicial da formação da crosta. No 7º dia apresentavam depósito de tecido de granulação, com crosta amarronzada, sem exsudação ou qualquer outro sinal de infecção, o que favoreceu a reepitelização no 14º dia do pós-operatório. Sendo o mesmo evidenciado até o 21º dia.

[028] As feridas dos animais do grupo controle (G2) apresentaram uma cicatrização mais lenta, no 3º dia do pós-operatório, apresentavam tecido de granulação, hiperemia no leito da ferida, mas sem a presença de exsudado. No 7º dia, as feridas apresentavam uma fina crosta de cor vermelha, com depósito de tecido de granulação nas bordas da ferida, a hiperemia permaneceu de moderada a intensa até o 14º dia. A total reepitelização, só ocorreu no 21º dia do pós-operatório.

[029] Os animais do grupo controle absoluto (G3) no 3º dia pós-operatório, as feridas apresentavam intensa deposição de tecido de granulação nas bordas e no centro, com leve hiperemia, e ausência de exsudado. No 7º dia, as bordas das feridas estavam irregulares e a hiperemia mais intensa. No 14º dia houve uma diminuição progressiva das áreas das lesões, e uma pequena área hiperémica no leito das feridas, com crostas aderidas ao centro. Como o grupo controle, a total reepitelização ocorreu apenas no 21º do pós-operatório.

[030] Na análise de contração das feridas, verificou-se que em todos os grupos houve uma diminuição progressiva das áreas das lesões ao longo dos dias. Estes resultados são observados nas Figuras 1, 2 e 3.

[031] Legenda da Figura 1- A, B, C e D, evolução cicatricial das feridas cutâneas dos ratos do grupo tratado com o creme de *C. ferrea*, no período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente de pós-operatório (foto em microscópio digital com câmera de 1,3 megapixels e Zoom de 20-200X).

[032] Legenda da Figura 2- A, B, C e D, evolução cicatricial das feridas cutâneas dos ratos do grupo controle com o creme de *C. ferrea*, no período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente de pós-operatório (foto em microscópio digital com câmera de 1,3 megapixels e Zoom de 20-200X).

[033] Legenda da Figura 3- A, B, C e D, evolução cicatricial das feridas cutâneas dos ratos do grupo controle absoluto com o creme de *C. ferrea*, no período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente de pós-operatório (foto em microscópio digital com câmera de 1,3 megapixels e Zoom de 20-200X).

[034] A análise estatística da comparação da área das feridas nos diferentes dias de avaliação, foi efetuada através de análise de variância de dois fatores: grupo x tempo. O nível mínimo de significância foi de $p < 0,05$ e valores expressos como média e desvio padrão. Os dados estatísticos de acordo com o método utilizado, baseado em escores médios para os 3

tratamentos não foram todos iguais, sendo que o maior grau de significância ocorreu no 21º dia para $p = 0,001$.

[035] As principais alterações encontradas na avaliação macroscópica das feridas cutâneas experimentalmente induzidas no dorso dos ratos, tanto dos grupos controle quanto do grupo submetido ao tratamento com o creme de *C. ferrea*, estão ilustradas nas Figuras 1,2 e 3.

[036] No que se refere à avaliação bioquímica, a administração tópica do creme de *C. ferrea* não alterou os parâmetros bioquímicos e hematológicos, estando dentro dos padrões normais fisiológicos para a espécie.

Exemplo 5. Teste de atividade antibacteriana *in vitro* do creme fitoterápico

[037] A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do creme, foi realizada pelo método de difusão em meio sólido de poço (GROOVE, D. C.; RANDAL, W. A. Assay methods of antibiotic a laboratory manual medical encyclopedie, Nova York, 1995) frente a oito (08) amostras bacterianas de campo do gênero *Staphylococcus* spp. obtidas de vacas com mastite clínica e subclínica. Tendo como controle o antibiótico vancomicina, diluído em solução salina (0,9%) na concentração entre 20 a 40µg/ml, preferencialmente 30µg/ml, solução salina a 0,9% e a lanolina anidra pura. O antibiótico vancomicina foi escolhido como controle, devido ao mecanismo de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* ao mesmo, à chamada VRSA (vancomicina–resistência *Staphylococcus aureus*) (RODRIGUEZ, C.A.; VESGA, Biomédica. 25:275-287, 2005).

[038] Com alça de platina estéril, as amostras bacterianas foram semeadas em tubos de ensaio contendo caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion), e incubadas em estufa a 37 °C por 24 a 48 horas, até atingirem turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala Mac Farland (BAUER, A. W. et al. Am. J. Clin Pathol. 45: 493-496, 1996). Em seguida, quando já se observava turvamento dos tubos, utilizando swab estéril foram realizadas as culturas, que foram distribuídas uniformemente sobre a superfície de placas de Petri, onde anteriormente foram confeccionados quatro (04) poços medindo 6 mm de diâmetro. Os mesmos foram preenchidos com: (1) lanolina, (2) antibiótico (vancomicina), (3) solução salina a 0,9% e (4) creme de *C. ferrea*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 24 horas. A leitura das placas foi realizada com auxílio de um halómetro. A sensibilidade das amostras foi considerada para medidas de halos inibitórios superiores a 12

mm em volta dos poços como preconizado por Bezerra et al. (Rev. Bras. Farmacog. 19(4): 814-817, 2009).

[039] O resultado da avaliação antimicrobiana, demonstrou que o creme apresentou atividade antibacteriana para as oito amostras testadas, após vinte quatro horas de incubação, com halos inibitórios de 13-21 mm. As mesmas amostras mostraram-se resistentes ao antibiótico padrão (vancomicina), usado como parâmetro de referência, com halos inibitórios de 7- 8 mm, menores que os considerados para medidas de ação inibitória, ou seja, 12 mm.

[040] Os resultados mostraram que o creme com extrato de frutos e sementes de *C. ferrea*, acelerou de maneira significativa o processo de reepitelização, em feridas cutâneas em ratos, nas condições experimentais aqui proposta, a partir do 3º dia após a injúria tecidual. Mostrando potencial ação terapêutica na cicatrização por segunda intenção. Podendo ser uma opção viável como cicatrizante na clínica médica veterinária.

REIVINDICAÇÕES

1. “PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA” **caracterizado por** um creme de uso tópico, de baixa toxicidade, compreendendo um extrato hidroalcoólico de uma mistura de frutos e sementes de *Caesalpinia ferrea* em um veículo hidrofóbico.
2. “PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** veículo hidrofóbico ser a lanolina.
3. “PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1 e 3, **caracterizado pelo** creme ser preparado a partir de uma mistura de extrato hidroalcoólico de uma mistura de frutos e sementes e lanolina na proporção de 9 partes de lanolina para 1 parte de extrato.
4. “PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** creme possuir atividade antibacteriana e cicatrizante.

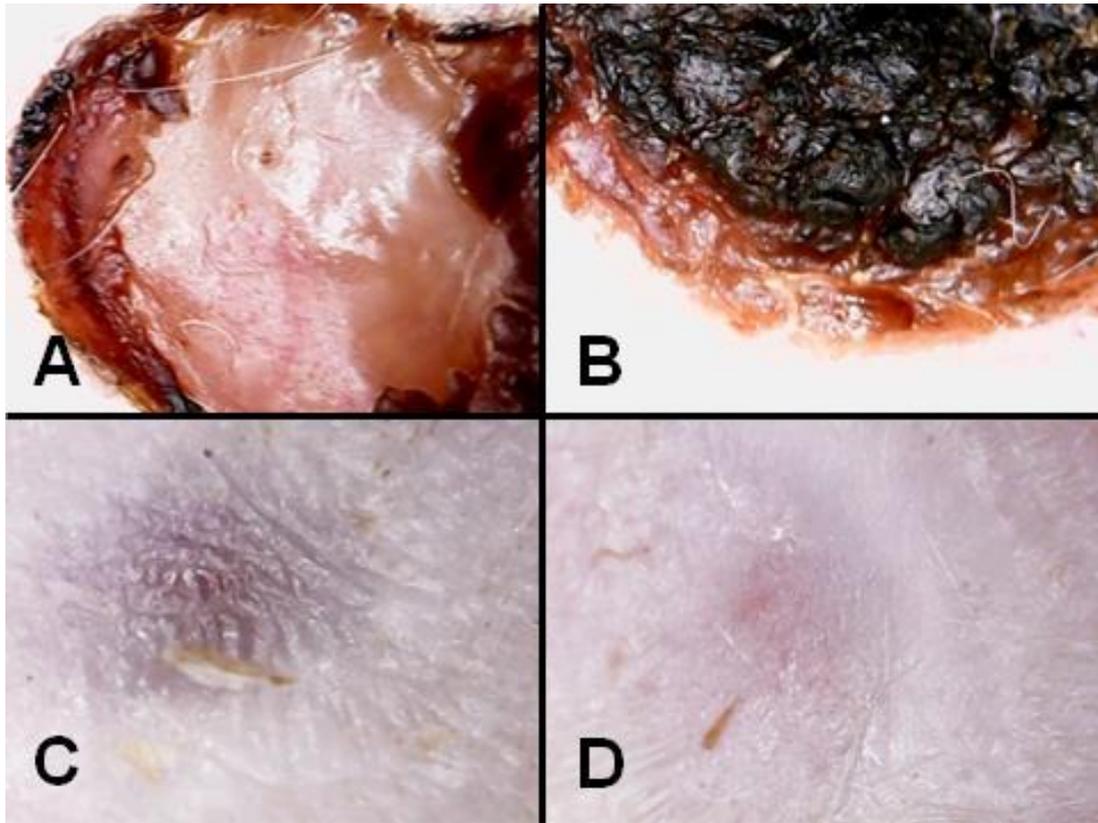


Figura 1

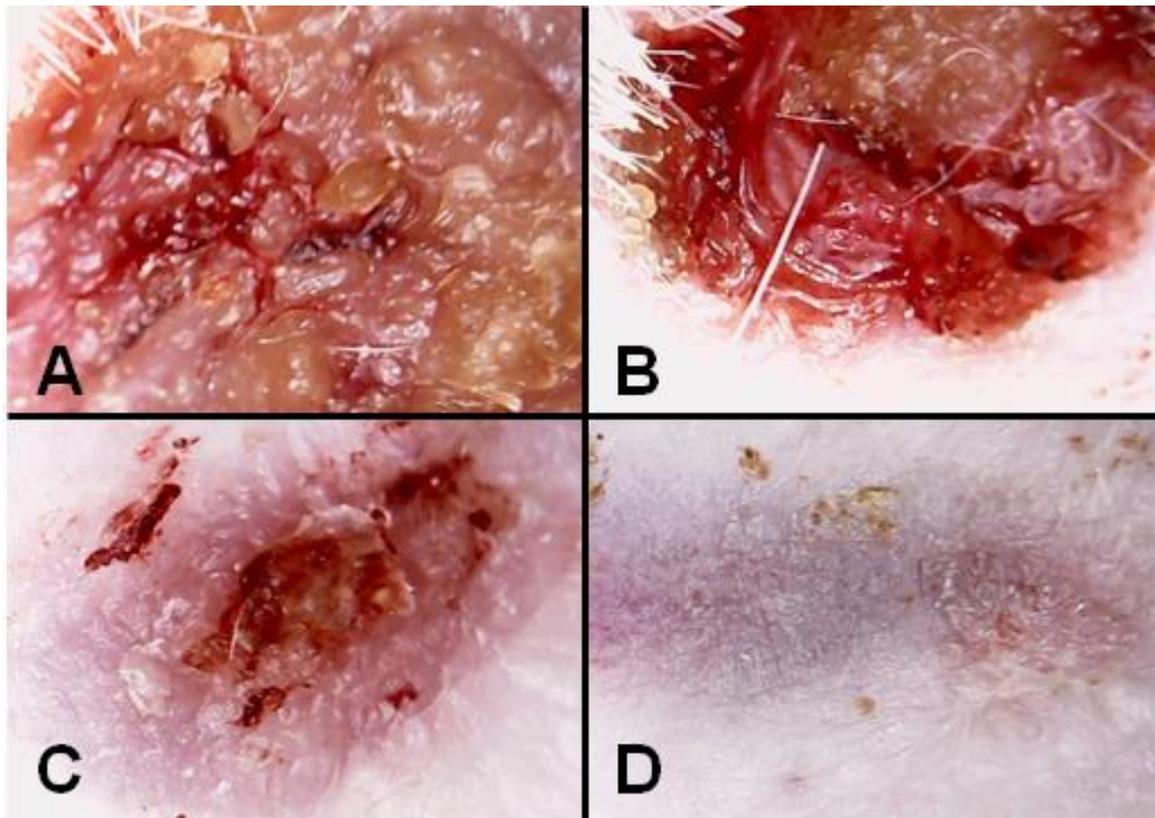


Figura 2

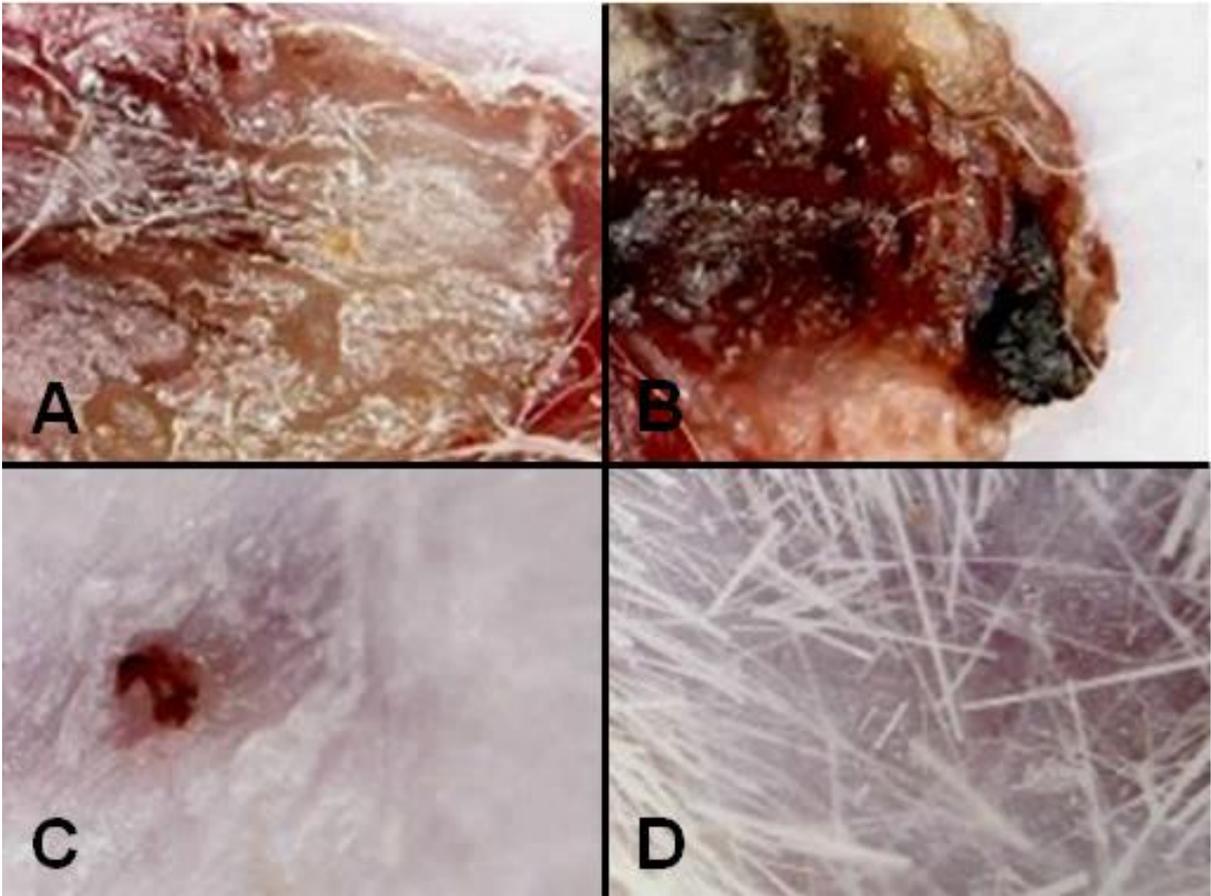


Figura 3

RESUMO

“PRODUTO FITOTERÁPICO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PAU-FERRO COM ATIVIDADE CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANA”.

A presente patente de invenção trata de um creme fitoterápico, não tóxico, de uso tópico, elaborada a partir de extrato exclusivamente vegetal de uma mistura de frutos e sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) e veículo orgânico, nas concentrações entre 9 a 10%, testada em modelo de cicatrização em ratos albinos. O que lhe conferiu ação aceleradora de processo de cicatrização de lesões cutâneas induzidas, reduzindo o tempo de reepitelização das mesmas, bem como, ação antibacteriana “*in vitro*” avaliada pela técnica de difusão em meio sólido de poço, frente amostras de *Staphylococcus* spp. poderá ser utilizado na cicatrização de feridas, como também no tratamento complementar na clínica médica veterinária, uma vez que apresenta atividade cicatrizante e antibacteriana quando administrado topicamente.