



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

(21) PI 1107283-0 A2

(22) Data do Depósito: 20/05/2011

(43) Data da Publicação: 22/09/2015
(RPI 2333)



(54) **Título:** POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (LINUM USITATISSIMUM L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/55; A61P 17/02

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) **Inventor(es):** ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA, ALEXANDRE JOSÉ DA SILVA GÓES, ANTÔNIO JOSÉ ALVES, PEDRO JOSÉ ROLIM NETO, MARIA BERNADETE DE SOUSA MAIA, ANA FLÁVIA VASCOCELOS PESSANHA, LARISSA ARAÚJO ROLIM, LAÍSE LOPES CHAVES, LARIZA DARLENE SANTOS ALVES, AMANDA CARLA QUINTAS MEDEIROS, MARIA LUÍZA CARNEIRO MOURA

(57) **Resumo:** POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (LINUM USITATISSIMUM L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO. A presente patente de invenção refere-se ao uso de uma formulação da forma farmacêutica pomada à base de óleo de linhaça (Linum usitatissimum L.) com ação cicatrizante para tratamento e prevenção de úlceras de pressão. Foram utilizadas como matérias-primas óleo de linhaça, parafina branca, cera de abelha, butilhidroxitolueno, metilparabeno, propilparabeno, vaselina sólida e propilenoglicol. Foi realizada a caracterização físico-química e avaliadas toxicidade, irritação e sensibilização dérmicas e reparação tecidual da pomada à base de óleo de linhaça em roedores e coelhos. Para a avaliação da toxicidade, foram utilizados diferentes modelos experimentais, utilizando camundongos e ratos. Na verificação da atividade sob a reparação tecidual, foram utilizados modelos de feridas, excisional e incisional, de ratos Wistar, avaliando a contração e re-epitelização da ferida. Os resultados obtidos revelaram que a pomada à base de óleo de linhaça não apresentou toxicidade, irritação ou sensibilização dérmicas nos(...)

POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO

A presente patente de invenção refere-se à formulação da forma farmacêutica pomada à base de óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) com ação cicatrizante para tratamento e prevenção de úlceras de pressão. Foi realizada a caracterização físico-química e avaliadas a toxicidade, irritação e sensibilização dérmicas, e a reparação tecidual do óleo de linhaça em roedores e coelhos. Os resultados demonstraram que a formulação apresenta uma excelente ação terapêutica, podendo ser utilizado no processo de dermo-reparação.

Na obtenção tecnológica da formulação, foram utilizados como matérias-primas: o óleo de linhaça (1-10%), cera de abelha (2-8%), butilhidroxitolueno (0,01-0,03%), parafina branca (2-8%), metilparabeno (0,16-0,2%), propilparabeno (0,01-0,03%), vaselina sólida (q.s.p. 100%) e propilenoglicol (q.s.).

A pomada foi obtida pela prévia solubilização do metilparabeno, propilparabeno e butilhidroxitolueno em propilenoglicol, seguida da adição desta solução ao óleo de linhaça e total homogeneização. Em seguida, à esta mistura, foram adicionadas a vaselina sólida, parafina branca e cera de abelha, homogeneizando-se. Os lotes foram acondicionados em bisnagas.

A formulação foi caracterizada realizando estudos de análise térmica, espectroscopia na região do infra-vermelho e determinação da espalhabilidade, atendendo aos parâmetros pré-estabelecidos.

Na avaliação da toxicidade dérmica aguda, foram utilizados 30-40 camundongos albinos *Swiss* (25-30g), machos e fêmeas. Cada animal foi mantido separadamente em gaiolas de metabolismo, e tiveram 5-15% da região dorsal depilada (na linha mediana cervical), 24-48 horas antes do procedimento experimental. Decorrido o tempo, foi aplicado topicamente, em cada animal, 90-100 mg da pomada à base de óleo de linhaça na área depilada. Após a aplicação, os animais foram atentamente observados entre 30-360 minutos e a cada 24-48 horas durante 10-20 dias. As observações incluíram a avaliação da pele e pêlo, olhos, salivação, tremores, convulsões, atividade motora, resposta a estímulos sensoriais, bem como outros sinais clínicos de toxicidade ou morte.

Ao final do ensaio, os animais sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO₂ e examinados macroscopicamente quanto a possíveis alterações em suas vísceras (coração, pulmões, rins, fígado, estômago, ovários, úteros e testículos). Como controle, foi aplicada a formulação placebo topicamente nos animais.

5 O tratamento agudo dos camundongos utilizando o óleo de linhaça, por via dérmica, não afetou a integridade dermo-epitelial nem provocou óbitos nos mesmos. A nível sistêmico, utilizando como parâmetro a avaliação macroscópica dos órgãos vitais, não foi observado indício de danos nos órgãos dos animais quando comparados com o controle.

10 Na avaliação da toxicidade dérmica sub-crônica, foram utilizados 20-30 ratos *Wistar* machos e fêmeas (200-250g), divididos em grupos. Cada animal foi mantido separadamente em gaiolas de metabolismo, e tiveram 5-15% da região dorsal depilada (na linha mediana cervical). 2-6 grupos receberam diariamente, durante 30-45 dias na região depilada, a pomada à base de óleo de linhaça, enquanto que um grupo controle
15 recebeu na mesma região e período, a formulação placebo. Os animais foram diariamente observados para registro de possíveis alterações fisiológicas e/ou comportamentais ou morte. O peso corpóreo de todos os animais foi determinado antes do início do tratamento e semanalmente até a conclusão do mesmo. No final do experimento, amostras de sangue de todos os animais, submetidos a prévio jejum de 8-
20 12 horas, foram coletadas através da punção do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, para análise de variáveis hematológicas (hemograma completo) e bioquímicas. Finalizada a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as vísceras (fígado, coração, rins, baço, pulmões, testículos e útero) foram removidas, pesadas e examinadas macroscopicamente.

25 Os parâmetros hematológicos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito) e os índices hematimétricos [volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)] foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas. A contagem diferencial de leucócitos (neutrófilo,
30 eosinófilo, basófilo, linfócitos e monócitos) foi realizada em extensões coradas.

Os parâmetros bioquímicos (gama-glutamyltranspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicérides, glicose,

proteínas totais e bilirrubina) foram determinados com o auxílio de um analisador automático.

5 Pôde-se observar que a aplicação tópica durante 30-45 dias da pomada à base de óleo de linhaça não afetou a ingestão de água ou alimentos, nem causou reações clínicas significativas como: prurido intenso, edema, eritema, diarreia, vômitos, mudanças de comportamento, ou mortes. As médias do peso corporal dos animais, machos e fêmeas, do grupo tratado com a pomada não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle.

10 A avaliação macroscópica e peso dos órgãos vitais (g/100g de peso dos animais) do grupo tratado com a pomada à base de óleo de linhaça não diferenciaram estatisticamente do controle.

Quanto à avaliação laboratorial, os perfis hematológico e bioquímico não apresentaram diferença estatisticamente significativa dos valores mensurados do grupo tratado (diferenciado pelo sexo), quando comparado ao grupo controle.

15 Para a avaliação da irritação dérmica do óleo de linhaça, foram utilizados 20-30 coelhos albinos machos e fêmeas divididos aleatoriamente em grupos. Cada animal foi mantido separadamente em gaiolas. Para o ensaio, cada animal teve duas áreas na região dorsal depilada (5-10 cm²): uma para aplicação da pomada à base de óleo de linhaça, ou formulação placebo, e, na segunda área, nada foi aplicado, permitindo assim que o animal fosse seu próprio controle. 3-6 horas após a aplicação, a área de teste foi
20 examinada em intervalos de 1-72 h, para avaliação da presença de eritema e/ou edema (mensuração da prega cutânea antes e após a aplicação com paquímetro digital) a partir de um sistema de escores.

Ao final do teste, os animais se apresentaram sem alteração relevante, indicado
25 através da ausência de edema perceptível, eritema mensurável ou visível nos animais tratados.

Para o teste de sensibilização dérmica, foram utilizados 10-15 cobaias albinos, adultos, machos e fêmeas, saudáveis, sem injúrias externas e sem alterações patológicas detectáveis, divididos aleatoriamente em grupos. Cada animal foi mantido
30 separadamente em gaiolas de metabolismo. Os animais do grupo tratamento receberam durante 2-5 semanas uma aplicação por semana da pomada à base de óleo de linhaça, na

pele da região dorso previamente depilada. O grupo controle foi tratado da mesma forma. 24-36 horas após a aplicação, as reações para edema e eritema foram analisadas.

O teste da sensibilidade dérmica não demonstrou características alergênicas nem de sensibilização dérmica quando comparado ao controle.

5 Para avaliação da reparação tecidual, foram utilizados 60-80 ratos *Wistar*, machos e fêmeas saudáveis (200-300g), como modelo biológico do experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e mantidos individualmente em gaiolas metabólicas de aço inoxidável, 24-72 h antes do procedimento cirúrgico, para que ocorresse a adaptação.

10 Como modelo de ferida excisional, foram utilizados 30-40 ratos *Wistar* os quais foram pesados e anestesiados com xilazina ($2-4 \text{ mg kg}^{-1}$) e cetamina ($8-12 \text{ mg kg}^{-1}$), por via intramuscular e, posteriormente, posicionados em decúbito ventral. Em seguida, foi realizada a tricotomia manual e antissepsia com álcool iodado 0,08-1,02%, na linha média dorsal da região cervical de cada animal. A área incidida foi demarcada usando
15 caneta cirúrgica e molde metálico vazado ($70-80 \text{ mm}^2$). No procedimento cirúrgico, para retirada da pele, tecido subcutâneo, panículo carnosos e fáscia, utilizou-se tesoura reta de frís e pinça de Adson. Após a incisão, foi suturado um aro de contenção confeccionado em silicone atóxico e hipoalergênico, utilizando-se 5-10 pontos isolados simples com fio monofilamentoso de náilon agulhado, distribuídos simetricamente, de
20 modo que a ferida cirúrgica permanecesse no centro.

Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos contendo pomada à base de óleo de linhaça, uma emulsão oleosa à base de óleo de girassol rica em ácidos graxos essenciais, como controle positivo e formulação placebo, como controle negativo. Foram aplicados 90-100 mg de cada substância diariamente, durante
25 10-20 dias, utilizando espátula metálica. As crostas das feridas de cada animal foram removidas para permitir a avaliação do tecido que se encontrava abaixo das mesmas e o valor real da área da ferida remanescente.

Na análise macroscópica do fechamento da ferida, para avaliar a contração das feridas tratadas com os diferentes produtos, as mesmas foram mensuradas diariamente
30 utilizando um paquímetro digital. Utilizou-se a equação $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde A representava a área (mm^2); “R”, o raio maior e “r”, o raio menor. As avaliações foram feitas pelo mesmo examinador, estando os animais sob contenção física. As feridas

foram avaliadas também quanto à presença de exsudato, formação de crosta, início da re-epitelização e presença de fibrina (esfacelos).

Para avaliar se o tratamento com a pomada à base de óleo de linhaça influenciou no tempo de fechamento das feridas excisionais, comparados aos grupos controle emulsão oleosa à base de óleo de girassol rica em ácidos graxos essenciais, como controle positivo, ou a formulação placebo, como controle negativo, as feridas de cada animal foram medidas diariamente. Foi observada uma redução significativa da contração das feridas e a reparação tecidual ocorreu uniformemente no grupo tratado com a pomada à base de óleo de linhaça

Quanto à variável, presença ou ausência de crosta, observamos um aumento significativo na presença de crosta com o grupo tratado com a pomada à base de óleo de linhaça.

Foi observado exsudado seroso nas primeiras horas após a cirurgia. Entretanto no decorrer de 10-20 dias de avaliação, não foi observada diferença significativa quanto à presença de exsudado no grupo tratado com a pomada.

A remoção da crosta foi necessária entre o 7º-10º dia, para possibilitar melhor contato da pomada à base de óleo de linhaça e visualização do leito da ferida. Com esta remoção foi possível avaliar, macroscopicamente, o tipo de tecido presente. Sendo significativo o aumento da presença de fibrina (esfacelo) no grupo tratado com a pomada, quando comparado com o grupo controle positivo, que não apresentou formação de esfacelo no leito da ferida. No mesmo dia, foi significativa a presença de esfacelo no grupo tratado com a pomada à base de óleo de linhaça, quando comparado com o grupo controle negativo (formulação placebo).

Quanto à re-epitelização, foi significativo o aumento de tecido de re-epitelização presente, a partir do 3º-5º dia, no grupo tratado com a pomada à base de óleo de linhaça, quando comparado ao grupo controle positivo. Esta mesma variável foi significativamente menor, entre 6º-8º dia, no grupo tratado com a pomada, quando comparada ao grupo controle negativo

Na análise microscópica morfológica, entre 10º-20º dia de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e, em seguida, foram mantidos em mesa cirúrgica para a coleta das lesões cutâneas. Todas as amostras obtidas foram fixadas em formol tamponado a 8-12% por um período de 24-48 h, e posteriormente foram

desidratados em etanol, diafanizados em xilol, processados para inclusão em parafina pelos métodos de rotina, e cortados em micrótomo ajustado para 3-6 μm . O material obtido foi colocado em lâminas previamente untadas com albumina.

Após a secagem, os cortes foram corados em hematoxilina-eosina para
5 observações da morfologia geral do tecido e tricrômico de Masson para analisar a organização das fibrilas de colágeno da derme. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico, cinco imagens por campo (área de 0,001-0,002 mm^2) foram capturadas com câmera digital por uma câmera fotográfica acoplado ao microscópio. As
10 imagens foram arquivadas e submetidas à contagem de células inflamatórias, células fibroblástica, número de vasos sanguíneos e avaliação da densidade de colágeno de todas as lesões com auxílio de marcação digital.

No modelo de ferida incisional, foram utilizados 30-40 ratos *Wistar* os quais foram pesados e anestesiados com xilazina (2-4 mg kg^{-1}) e cetamina (8-12 mg kg^{-1}) por via intramuscular. Posteriormente, foram posicionados em decúbito ventral. Em
15 seguida, foi realizada a tricotomia manual e antissepsia com álcool iodado 0,08-1,2%, na região da linha média dorsal. Posteriormente, realizou-se uma incisão utilizando lâmina de bisturi, paralela à coluna vertebral de três centímetros de comprimento. O retalho cutâneo pré-estabelecido foi constituído pela pele, tecido subcutâneo, fáscia superficial até atingir o panículo carnosos. O local foi dissecado com dissecação romba
20 para deslocamento do plano músculo-aponeurótico adjacente, em seguida reposicionado e suturado com 2-4 pontos simples interrompidos utilizando fio monofilamentoso de náilon agulhado. Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos contendo a pomada à base de óleo de linhaça, uma emulsão oleosa à base de óleo de girassol rica em ácidos graxos essenciais, como controle positivo, e formulação placebo,
25 como controle negativo. Foram aplicados 90-100 mg de cada formulação diariamente durante 7-15 dias. As suturas foram removidas entre o 6º-9º dia e as feridas continuaram a ser tratadas até a avaliação da resistência da pele entre 10-15º dia. Para tal avaliação, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e a pele do local da ferida foi removida e avaliada quanto à resistência em máquina universal de ensaio mecânico,
30 com garras de pressão ajustável manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados computadorizado.

Os ensaios pré-clínicos, empregados para avaliar a segurança de uso da pomada à base de óleo de linhaça, demonstraram que o mesmo não apresenta riscos quando administrado por via dérmica nos modelos testados. Observou-se que 100% dos animais dos grupos tratados com a pomada à base de óleo de linhaça apresentaram re-epitelização completa ao final do experimento, sendo este resultado significativo, quando comparado com o grupo controle negativo (formulação placebo).

REIVINDICAÇÕES

POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO.

5 **1 - POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO,** caracterizado por conter como insumo farmacêutico ativo o óleo de linhaça.

10 **2 - POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar excelente efeito sob a reparação tecidual, possibilitando a re-epitelização em 100% dos animais tratados, não causando danos à pele íntegra.

15 **3 - POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO,** de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por conter como excipientes parafina branca, cera de abelha, butilhidroxitolueno, metilparabeno, propilparabeno, vaselina sólida e propilenoglicol.

20 **4 - POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO,** de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por não apresentar toxicidade dérmica nos modelos animais utilizando camundongos e ratos.

25 **5 - POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO,** de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por não apresentar sensibilização dérmica no modelo animal utilizando cobaias albinos.

30 **6 - POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO,** de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado por não apresentar irritação dérmica no modelo animal utilizando coelhos.

RESUMO

Patente de invenção: POMADA À BASE DE ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) COM AÇÃO CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE ÚLCERAS DE PRESSÃO

5 A presente patente de invenção refere-se ao uso de uma formulação da forma farmacêutica pomada à base de óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) com ação cicatrizante para tratamento e prevenção de úlceras de pressão. Foram utilizadas como matérias-primas óleo de linhaça, parafina branca, cera de abelha, butilhidroxitolueno, metilparabeno, propilparabeno, vaselina sólida e propilenoglicol. Foi realizada a

10 caracterização físico-química e avaliadas toxicidade, irritação e sensibilização dérmicas e reparação tecidual da pomada à base de óleo de linhaça em roedores e coelhos. Para a avaliação da toxicidade, foram utilizados diferentes modelos experimentais, utilizando camundongos e ratos. Na verificação da atividade sob a reparação tecidual, foram utilizados modelos de feridas, excisional e incisional, de ratos *Wistar*, avaliando a

15 contração e re-epitelização da ferida. Os resultados obtidos revelaram que a pomada à base de óleo de linhaça não apresentou toxicidade, irritação ou sensibilização dérmicas nos modelos animais utilizados. Com relação à reparação tecidual, o grupo tratado com a pomada à base de óleo de linhaça iniciou o processo de re-epitelização, significativa, quando comparado ao grupo controle placebo. A administração tópica da pomada à base

20 de óleo de linhaça em feridas experimentais excisionais, possibilitou a re-epitelização em 100% dos animais tratados e não causou danos à pele íntegra.