



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102013005468-2

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 102013005468-2

(22) Data do Depósito: 22/02/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 02/06/2015

(51) Classificação Internacional: A61K 33/38; A61K 36/48; A61P 31/04; A61P 17/02; B82Y 5/00.

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM ÓLEO DE COPAÍBA PARA PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTO CICATRIZANTE E/OU BACTERICIDA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: Campus A.C. Simões, Av. Lourival de Melo Mota s/n, Maceió-AL, AL, BRASIL(BR), 57072970

(72) Inventor: CÁSSIO ERÁCLITO ALVES DOS SANTOS; EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO; JANDIR MIGUEL HICKMANN; ISABELA KARINE RODRIGUES AGRA; RAFAEL VITAL DOS SANTOS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 22/02/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 20/09/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Relatório descritivo para patente de invenção: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM ÓLEO DE COPAÍBA PARA PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTO CICATRIZANTE E/OU BACTERICIDA

Campo da Invenção

5 A presente invenção trata de uma composição compreendendo nanopartículas de prata incorporadas em óleos vegetais, como o óleo de copaíba puro ou em formulações (loção, creme, pomada e gel), para utilização como cicatrizante e bactericida, visando acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas. A referida composição pode ser utilizada nas áreas médica, farmacêutica, odontológica e veterinária.

Estado da Técnica e Antecedentes

15 A pele serve como uma barreira protetora contra agentes do ambiente, e a perda da integridade cutânea e a ausência de uma reparação adequada podem proporcionar deficiências sistêmicas graves ou mesmo a morte. A cicatrização é um processo ordenado de reparo que ocorre após lesão desencadeada por estímulos de diferentes naturezas. A cicatrização ocorre em três fases: proliferação, inflamação e remodelação. Assim, as feridas exigem cuidados intensivos com a antisepsia e monitoramento clínico, visando evitar crescimento bacteriano, formação de tecido de granulação exuberante e retração excessiva da cicatriz. A possibilidade de interferir positivamente no processo cicatricial pode significar um ganho na qualidade de vida dos pacientes, além de redução de custo nos cuidados dispensados e na melhora da qualidade final do processo regenerativo. Apesar de existirem medicamentos disponíveis para o tratamento de feridas cutâneas, o custo e as reações adversas ao paciente

20 mostram-se como fatores que limitam o uso dos mesmos.

25 Os tratamentos das lesões cutâneas incluem o uso de medicamentos em diferentes tipos de formulações, tais como pós, loções, cremes, géis, pastas, pomadas, sprays, aerosóis, etc. Independente do tipo de medicamento, o tratamento das lesões tem grande importância clínica, devido ao tempo de re-

solução, desconforto causado e necessidade de cuidados diários que apresentem. Além disso, os medicamentos disponíveis têm potencial de irritação a períodos de exposição prolongados, e também limitação de acesso aos produtos pelo preço elevado.

- 5 Dentre os medicamentos disponíveis, citam-se os mais usados para cicatrização de feridas cutâneas: a) Fibrase®: é indicada no tratamento de lesões cutâneas, tais como queimaduras, úlceras e feridas, nas quais apresenta dupla ação, como agente debridante e antibiótico tópico. Para este medicamento já foram relatados casos de hipoplasia da medula óssea, incluindo anemia aplástica e morte. b) Dermazine®: possui em sua composição Sulfadiazina
- 10 de Prata 1% micronizada com mecanismo de ação sobre a membrana celular e parede celular microbiana, promovendo o enfraquecimento destas, com consequente rompimento da célula, estando aí o seu efeito bactericida. Como desvantagem pode se destacar sua pouca absorção nos tecidos humanos, além
- 15 de que, quando usado em áreas muito extensas de superfície corporal, a monitoração dos níveis séricos da Sulfa e da função renal torna-se relevante. Em adição, algumas das reações adversas usualmente vistas com sulfonamida sistêmica (síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de Lyell, driscrasia e cristalúria) podem ocorrer durante terapia com Dermazine®, embora raras, dependendo da porcentagem de superfície corporal em que Dermazine® é aplicado e
- 20 a profundidade do tecido lesado.

A presente invenção apresenta-se como produto alternativo a esses medicamentos, resultante da associação de nanotecnologia e fitoterapia.

- A proposta refere-se a um produto que utiliza conjuntamente os efeitos
- 25 cicatrizantes do óleo de copaíba (*Copaifera ssp*) e bactericida da prata nanoestruturada. Essa associação é o diferencial da presente invenção, visto que aplicações anteriores utilizam somente um dos componentes, como exposto nos documentos de depósito das patentes:

- PI0404266-2: "Método de Fabricação de um Gel De Óleo de Copaíba (*Copaifera Multijuga*) com Atividade Antibacteriana para Controle de Placa ou Biofilme
- 30 Dental";
-

PI1004276-8: "Composição farmacêutica a base de óleo de copaíba padronizado (*Copaifera ssp*) para tratamento de afecções ginecológicas";

MU8203234-3: "Tratamento de hemorroidas, com óleo vegetal extraído de plantas da espécie das *Copaiferas* (copaíba);

5 US2010/0317617: "Silver nanoparticles as anti-microbial";

WO2012/059943: "Pale yellow coloured aqueous dispersion of silver nanoparticles, a process for preparation and compositions thereof";

WO2009/049208: "Use of nitric oxide to enhance the efficacy of silver and other topical wound care agents";

10 US2010/0056485: "Nanosoap containing silver nanoparticles".

Sumário da Invenção

A presente invenção trata de uma composição contendo nanopartículas de prata dispersas em um óleo, preferencialmente óleo de copaíba (*Copaifera ssp*), apresentando conjuntamente os efeitos cicatrizantes do óleo de copaíba e bactericida da prata nanoestruturada. Os resultados de cicatrização epitelial com a aplicação da composição proposta apresentaram um efeito sinérgico, superior aos efeitos isolados das duas substâncias, e também aos de medicamentos comerciais. A composição gerada pode ser apresentada na forma do próprio óleo de copaíba puro com as nanopartículas de prata dispersas ou incluída em formulações, nas formas de sabonete, creme, pomada e gel. Também em formulações para embeber curativos. Pode ser utilizada em animais em geral e seres humanos (adultos, crianças e gestantes).

Descrição das Figuras

Análise histológica da ferida possibilitou avaliar a qualidade do processo de cicatrização. As figuras 1 e 2 mostram a histologia das feridas após o tratamento com solução salina(1), óleo de copaíba (2), nanopartículas de prata (NanoAg) (3), nanopartículas de prata em copaíba(4) ou Dermazine (5) no 9º dia após a lesão. Os resultados do exame histopatológico estão resumidos na Tabela 1.

A análise histopatológica de feridas tratadas com soro fisiológico (salina) demonstra uma epiderme totalmente desorganizada. Além disso, observa-se também uma menor epitelização, bem como uma menor deposição de tecido conjuntivo no grupo de animais tratados com salina (Figura 1 e 2). Áreas de degeneração tecidual, necrose e à persistência de exsudatos inflamatórios na derme superior foi observada, juntamente com uma perda da epiderme (setas). Em comparação, as feridas infectadas tratadas com CO ou NanoAg mostrou um menor teor de áreas necróticas do que aqueles tratados com solução salina isolada (Figura 1 e 2).

Os animais tratados com NanoAgCO ou o medicamento de referência Dermazine®, por outro lado, mostrou atenuação na infiltração de células inflamatórias e da proliferação aumentada de fibroblastos (setas). No tratamento com NanoAgCO houve uma re-epitelização completa, resultando em uma epiderme bem organizado (*), comparável à da pele normal adjacente, que não estava envolvida na geração de feridas e cicatrização (Figura 1 e 2). As feridas tratadas com NanoAgCO demonstraram uma formação melhorada da epiderme e a deposição de tecido conjuntivo, quando comparado com os outros grupos (Figura 1 e 2).

Descrição da técnica

Uma forma preferencial de preparo da dispersão das nanopartículas de prata foi realizada através da redução de nitrato de prata com o citrato de sódio, como relatado por Nath & Chilkoti (NATH N.,CHILKOTI, A., 2002. **Anal Chem.** 74:504-509) e, em seguida, feita a dispersão em óleo de copaíba, conforme descrito a seguir. Um grama de AgNO_3 foi dissolvido em 100 mL de água ultra pura deionizada e aquecido, permanecendo sob vigorosa agitação durante o aquecimento. Após atingir o ponto de ebulição, adicionou-se rapidamente 1,5 mL de 0,13 M de citrato de sódio. Durante o processo de ebulição da solução, mantido por 10 minutos, a cor da solução mudou para cinza. A solução foi deixada arrefecer até a temperatura ambiente, continuando a ser agitada. Após o resfriamento, foi levada a centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos.

Esse procedimento foi repetido diversas vezes até a obtenção de 1mg de nanopartículas de prata em pó. Depois de um processo de secagem a baixa pressão (em torno de 10^{-2} Pa), 1 mg do pó resultante foi misturado em 100 mL de óleo de copaíba e submetido a ondas ultrassônicas durante cerca de 1 h. A dispersão das nanopartículas no óleo foi observada utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

A incorporação das nanopartículas de prata em óleo de copaíba pode ocorrer por diferentes métodos, incluindo *sputtering*, método químico e mecânico. O método *sputtering* permite a geração do produto em escala industrial.

A composição gerada pode ser apresentada em óleo de copaíba puro ou em formulações, nas formas de sabonete, creme, pomada e gel. Também em formulações para embeber curativos.

Pode ser utilizada em animais em geral e seres humanos (adultos, crianças e gestantes).

Exemplo 1

Foram realizados testes de cicatrização em 20 camundongos (*Mus musculus*), divididos em cinco grupos de 4 animais. Cada grupo recebeu a aplicação de diferentes produtos, sendo que o grupo 1, controle, recebeu solução salina NaCl a 0,9%, o grupo 2 recebeu a aplicação de óleo de copaíba CO, o grupo 3 recebeu somente a nanopartícula de prata em pó, o grupo 4 a nanopartícula de prata dispersa em óleo de copaíba e o grupo 5 Dermazine®.

Os animais foram anestesiados com éter e tiveram a pelagem raspada antes da indução do ferimento. Utilizando lâmina cirúrgica, uma ferida (1,6 cm de diâmetro) foi induzida na pele dorsal dos animais, que foram mantidos individualmente nas gaiolas e com as feridas expostas. Para a infecção foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a 10^8 CFU (Colony Forming Unit). Todos os animais receberam topicamente (200 µl) dos tratamentos uma vez ao dia por nove dias consecutivos, iniciando no dia da indução da ferida. Os animais tratados com Dermazine® receberam uma vez ao dia 0,5 g da pomada topicamente. A cicatrização na área da ferida foi monitorada e dimensionada por câmera fotográfica nos tempos: 3º, 6º e 9º dia.

O grupo 4, que recebeu o tratamento nanopartícula de prata dispersa em óleo de copaíba (NanoAgCO), apresentou como resultado, em relação aos outros grupos, um aumento na área reconstituída em todos os tempos, reduzindo significativamente o tempo de cicatrização.

5 O efeito da nanopartícula de prata dispersa em óleo de copaíba (Nano-AgCO) sobre a contração e a cicatrização de feridas infectadas em ratos foi analisada com base em dois métodos diferentes:

1) A aferição da área da ferida aberta em relação à ferida original infligida no final do 3º, 6º e 9º dia, e

10 2) Uma avaliação das alterações histopatológicas no tecido da ferida fechada no nono dia após o início do tratamento.

A Tabela 1 resume os processos de fechamento de feridas infectadas, observadas para os diferentes tratamentos, mostrando a área da ferida nos dias 3, 6 e 9.

15 Tabela 1. Efeito dos tratamentos na área de feridas infectadas

Tratamento	Parâmetros			
	Área da ferida nos dias, em cm ²			Período de Epitelização (em dias)
	3	6	9	
Solução salina	1,59	1,38	1,17	17,50
CO	1,61	1,27	0,90	17,50
NanoAg	1,58	1,22	0,92	17,00
NanoAgCO	1,44	1,00	0,44	12,50
Dermazine®	1,53	1,18	0,71	15,00

Os animais tratados com a NanoAgCo apresentaram uma contração da ferida, em relação à área inicial de continuidade, de 28% no dia 3 , 50 % no dia 6 e 78% no dia 9, representando resultados superiores, em todos os tempos, das obtidas com Solução Salina, óleo de copaíba, nanopartículas de prata e Dermazine®. No documento PI1015731-0 é relatado o uso de fibrase®, com

20 uma contração na ferida de 74% aos 9 dias.

Após a aplicação tópica de uma solução salina em feridas infectadas, a área contração da ferida foi de 20,5% em relação ao seu tamanho original (2 cm²) no dia 3, 31% no dia 6, e de 41,5% no dia 9. O ferimento acabou completamente fechado em torno do 17º dia. Os animais tratados com NanoAg mostraram uma taxa de contração da ferida, de 21% no dia 3, 39% no dia 6 e 54% ao dia 9, em relação ao seu tamanho original. Um perfil de cicatrização semelhante foi observada com os animais tratados com CO. A área da ferida foi reduzida em 19,5% no dia 3, de 36,5% no dia 6, e de 55% no dia 9. A ferida tratada com NanoAg ou CO mostrou um período de epitelização de cerca de 17 dias.

A aplicação do óleo de copaíba puro não produziu qualquer melhoria significativa sobre o uso NanoAg; o fechamento da ferida mensurado após 9 dias foi de 55% para o óleo de copaíba puro e 54% para NanoAg, respectivamente. Ainda, a taxa de contração da ferida do medicamento de referência Dermazine® foi mais baixa do que a NanoAgCO proposto, sendo de 23,5% no dia 3, de 41% no dia 6, e de 64,5% no dia 9. Notou-se que os ratos tratados com a NanoAgCO demonstraram um fechamento da ferida consideravelmente acelerado entre os tempos pós-cirúrgicos de 6 e 9 dias, com um período médio de epitelização de apenas 12,5 dias. A NanoAgCO supera claramente os tratamentos comparados, incluindo a referência Dermazine®.

Exemplo 2

A análise histológica da ferida possibilitou avaliar a qualidade do processo de cicatrização. As figuras 1 e 2 mostram a histologia das feridas após o tratamento com solução salina (soro fisiológico), óleo de copaíba (CO), nanopartículas de prata (NanoAg), nanopartículas de prata em copaíba (NanoAg-CO) ou Dermazine® no 3º e 9º dia após a lesão (Tabela 1).

A análise histopatológica de feridas tratadas com soro fisiológico (solução salina) demonstra uma epiderme totalmente desorganizada. Além disso, observa-se também uma menor epitelização, bem como uma menor deposição de tecido conjuntivo no grupo de animais tratados com solução salina (Figura

2). Áreas de degeneração tecidual, necrose e persistência de exsudatos inflamatórios na derme superior foram observadas, juntamente com uma perda da epiderme. Em comparação, as feridas infectadas tratadas com CO ou NanoAg mostraram um menor teor de áreas necróticas do que aqueles tratados com solução salina isolada (1) (Figura 1).

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para cicatrização de feridas cutâneas, caracterizada por compreender formulação contendo nanopartículas de prata incorporadas em óleo de copaíba;
5
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser para uso em feridas infectadas ou não infectadas;
3. Composição, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada por compreender de 0,001% a 1% (p/p) de nanopartículas de prata;
- 10 4. Composição, de acordo com as reivindicações de 1 a 3, caracterizada por apresentar redução do tempo de cicatrização de feridas cutâneas infectadas de pacientes com ferimentos em geral inclusive queimaduras;
5. Composição, de acordo com as reivindicações 1 a 3 caracterizada por ser para utilização em produtos magistral, farmacêuticos, odontológicos e veterinários de uso externo;
15
6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por ser para a preparação de composições farmacêuticas, odontológicas e veterinárias em forma de filmes, pomadas, loções, cremes, géis, sabões;
- 20 7. Composição, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada para a preparação de composições farmacêuticas, odontológicos e veterinários em formulações para embeber curativos;
- 25 8. Composição, de acordo com as reivindicações 5, caracterizada para a preparação de composições farmacêuticas, odontológicos e veterinários em formulações para ser incorporado em diferentes materiais aplicados sobre as feridas cutâneas infectadas e não-infectadas;

9. Composição, de acordo com as reivindicações de 5 a 9, caracterizada por ser aplicado sobre lesões cutâneas, infectadas ou não, em adultos, crianças e gestantes;
- 5 10. Composição, segundo as reivindicações de 1 a 9, caracterizada por compreender formulações contendo nanopartícula de prata incorporado em óleo de copaíba associados a excipientes provenientes de outras fontes naturais, nas apresentações contendo um percentual de até 1% da respectiva nanopartícula;
- 10 11. Composição, segundo qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada por compreender formulações medicamentosas com constituinte(s) químico(s), fração(ões), sumos do óleo de copaíba, contendo percentuais de até 80% em peso da soma dos respectivos produtos;
- 15 12. Composição, segundo qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizada por compreender formulações medicamentosas de forma associada a outras nanopartículas metálicas ou poliméricas incorporadas em óleo de copaíba, adequados ao tratamento de cicatrização de feridas cutâneas infectadas e não-infectadas;
- 20 13. Composição, segundo qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizada por compreender formulações medicamentosas de forma associada a outras nanopartículas metálicas ou poliméricas incorporadas em óleos com propriedades medicinais, adequados ao tratamento de cicatrização de feridas cutâneas infectadas e não-infectadas.

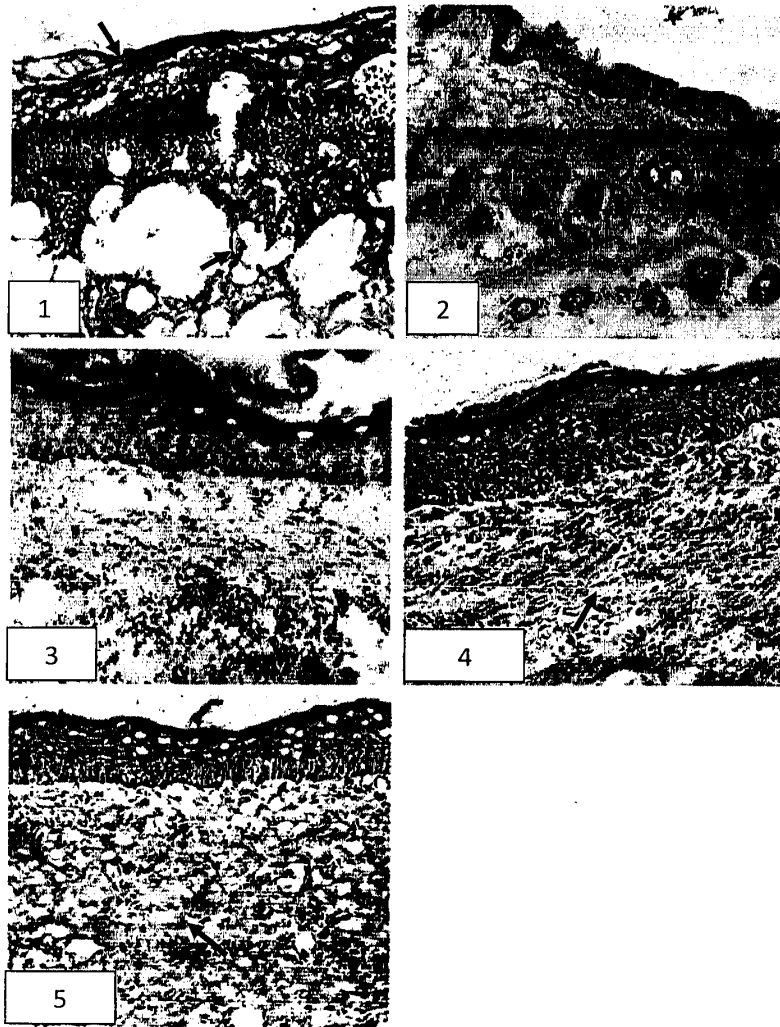


Fig. 01

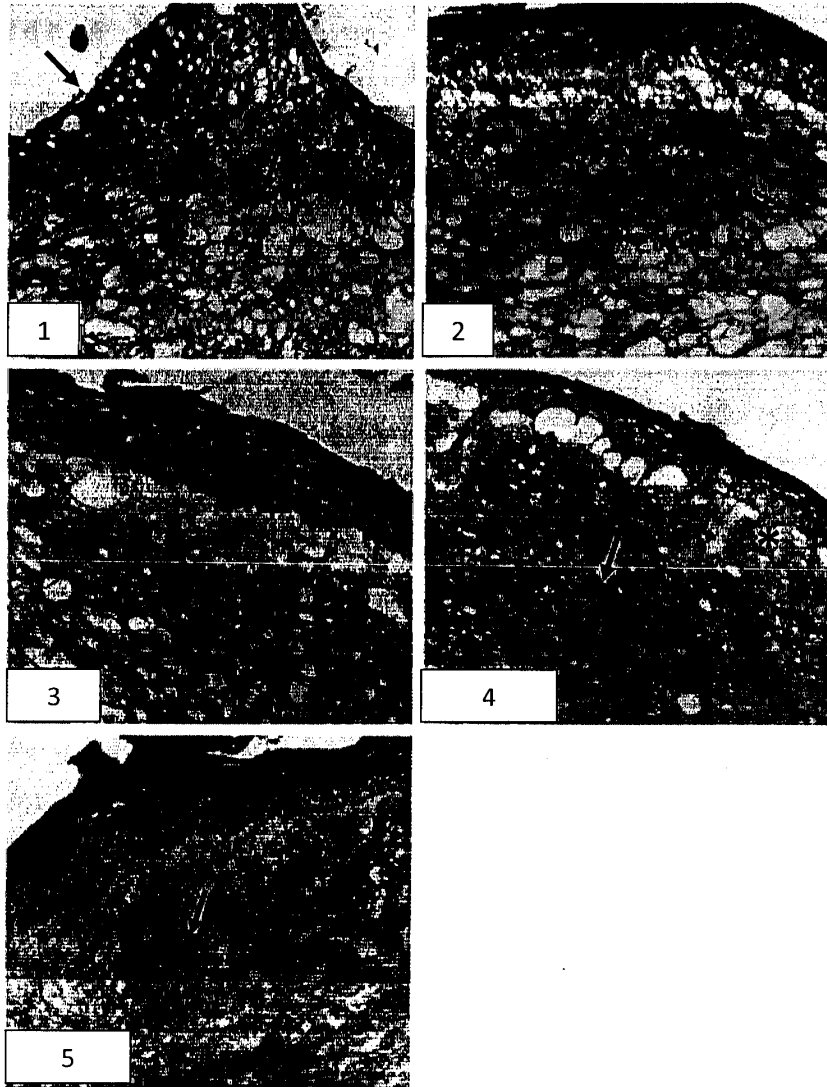


Fig. 02