



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

CARTA PATENTE Nº BR 102018071844-4

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 102018071844-4

(22) Data do Depósito: 24/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 05/05/2020

(51) Classificação Internacional: A61K 36/48; A61P 31/04; A61P 29/00; A61P 17/02; A61P 17/00; A61K 8/9789; A61Q 19/00; A61Q 19/08.

(66) Prioridade Interna: BR102018000783-1 de 15/01/2018.

(54) Título: USO DO EXTRATO DE PIPTADENIA GONOACANTHA PARA PRODUÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS, CICATRIZANTES E ESTIMULADORES DE COLÁGENO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, Brasileira. CGC/CPF: 25944455000196. Endereço: CAMPUS UFV, PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO, SALA 04, VICOSA, MG, BRASIL (BR), 36570-000, Brasileira

(72) Inventor: CAMILO AMARO DE CARVALHO; MARILANE DE OLIVEIRA FANI AMARO; LEANDRO LICURSI DE OLIVEIRA; MARCELO BARCELLOS DA ROSA; ADRIANE JANE FRANCO; CÁSSIA GONDIM PEREIRA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 24/10/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 07/11/2023

Assinado digitalmente por:
Alexandre Dantas Rodrigues
Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

USO DO EXTRATO DE *Piptadenia gonoacantha* PARA PRODUÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS, CICATRIZANTES E ESTIMULADORES DE COLÁGENO.

CAMPO DA INVENÇÃO

1. A presente invenção refere-se ao uso da *Piptadenia gonoacantha* para a produção de agentes antimicrobianos, cicatrizantes e estimuladores de colágeno. As formulações apresentam-se nas formas farmacêuticas e dosagens galênicas líquidas, semissólidas e sólidas, tais como: bálsamo, sabonete, ampolas, xaropes, soluções, suspensões, emulsões, pomadas, cremes, gel, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e drágeas, todas as quais contendo preparações originárias dessa espécie.

ESTADO DA TÉCNICA

2. A resistência bacteriana aos fármacos disponíveis para o tratamento clínico tornou-se um problema de saúde pública em todo mundo. Além disso, o custo financeiro de uma terapia fracassada devido aos microrganismos resistentes é muito grande, onerando ainda mais os sistemas públicos de saúde (Del Fiol, F.S.; Lopes, L.C.; Toledo, M.I.; Barberato-Filho, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Vol.43, n.1, p.68-72, 2010). Esses constituem os únicos medicamentos que influenciam não apenas no paciente em tratamento, mas em todo o ecossistema onde está inserido, com repercussões potencialmente profundas (Avorn, J.; Solomon, D.H. Cultural and economic that (mis) shape antibiotic use: the nonpharmacologic basis of therapeutics. Annals of Internal Medicine. Philadelphia-US, v.133, p.128-135, 2000). Esta preocupação mundial faz com que a resistência bacteriana seja objeto de diversas publicações sobre antimicrobianos (Wannmacher, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; v.1, n.4, 2004).

3. De acordo com Freitas *et al.* (Freitas, A. G.; Farias, E.T.; Lima, M.C.A.; Sousa, I.A.; Ximenes, E.A. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. In: Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 12, supl., p. 64-65, 2002), o uso excessivo e inadequado de antibióticos tem contribuído para o aumento da resistência microbiana. Embora o desenvolvimento da resistência seja um fenômeno espontâneo, as drogas atuam como agentes seletivos de amostras resistentes, e com o passar do tempo vão surgindo microrganismos resistentes a vários fármacos (Chaves T. P.; Dantas I. C.; Felismino D. C.; Vieira K. V. M.; Clementino E. L. C.; Costa L. S. (2011) Revista de Biologia e Farmácia, v. 5, n. 2, p.12).

4. A atividade antibacteriana de extratos vegetais e fitofármacos, avaliada frente a microrganismos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais, são bastante relevantes, permitindo concluir que estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados. O uso de extratos vegetais com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante tem aumentado grandemente no tratamento terapêutico por via tópica e sistêmica. Vários estudos têm sido realizados em diferentes países, para comprovar a eficácia de produtos naturais de origem vegetal, com o objetivo de se obter fontes alternativas ao uso de fármacos obtidos por síntese, dos quais muitos microrganismos já apresentam resistência (Djipa CD, Delmee M, Quetin-Leclercq J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). J Ethnopharmacol. 2000; 71(1-2): 307-313; Belinelo VJ, Teixeira AL, Ferreira-Alves DL, Piló-Veloso D, Reis GT, Stefani GM. Síntese de amidas derivadas do ácido 6alfa,7beta-dihidroxivouacapan-17beta-óico isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae). Rev. bras. plantas med. 2013; 2:37-44; Feresin GE, Tapia A, Lopez SN, Zacchino SA. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. J Ethnopharmacol. 2001; 78(1): 103-7; Khan MR, Kihara AD, Omoloso AD. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. Fitoterapia. 2001; 72(7): 825-8; Akinpelu DA, Onakoya TM.

Antimicrobial activities of medicinal plants used in folklore remedies in south-western Africa. Afr. J. Trad. CAM. 2006; 3: 112-5; Chopra I. The increasing use of silver based products as microbial agents: A useful development or a concern. J. Antimicrob. Chemother. 2007; 59: 587-590; Silva LLS, Lima EO, Nascimento SC, Mota DL, Silva NH, Almeida ER, Silva MGS. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth, Fabaceae. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20(2): 208-14; Padilha IQM, Pereira AV, Rodrigues OG, Siqueira-Júnior JP, Pereira MSV. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Rev. Bras. Farmacogn. 2010; 20(1): 45-7; Santos VL, Souza MFV, Batista LM, Silva BA, Lima MS, Souza AMF, Barbosa FC, Catão RMR. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). Rev. bras. plantas med. 2011; 13(1): 68-72, Bonella AF, Natalli VD, Camizão LM, Vieira FA, Belinelo VJ. Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Acanthospermum australe* (Loerfl.) Kuntze. Enciclopedia Biosfera. 2011; 7(13): 1-7, Natalli VD, Barcelos RM, Pinto APA, Resende KM, Belinelo VJ. Investigação fitoquímica e atividade antimicrobiana de *Amaranthus viridis* L. (Amaranthaceae) Enciclopedia Biosfera. 2011; 7(12):1-9).

5. De acordo com Cuzzell e Krasner (Cuzzel, J. Krasner, D. Curativos. In: Gogia, P. Feridas – Tratamento e Cicatrização. Rio de Janeiro: Revinter, 2003, cap 9, p. 103-114), existem no mercado mais de 2.500 itens que se destinam ao tratamento de feridas agudas e crônicas, desde formas mais simples, como o uso de emplastos, pomadas, soluções para higienização e antissepsia, bem como o uso de procedimentos complexos, chamados “curativos inteligentes” ou “bioativos”, que interferem de forma ativa nas diversas fases do processo cicatricial, em diferentes tipos de feridas. Contudo, uma resolução do Ministério da Saúde (Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Manual de prevenção de incapacidades. Brasília, 2000. 107p) dispôs sobre o registro de produtos

fitoterápicos, e recomendou à preparação de medicamentos à base de algumas plantas medicinais, mostrando a necessidade de produtos fitoterápicos (Moreira, R.A.; Acúrio, F.A.; Brandão, M.G.L. Interesse de farmacêuticos, envolvidos em dispensação, por plantas medicinais e fitoterapia. Rev. Pharmácia Brasileira, n. 25, p.72-75. 2001). Corroborando com estes dados está o crescimento do mercado de plantas medicinais, que se deve, principalmente, à grande tendência da busca por remédios fitoterápicos, vinculada especialmente a fatores socioeconômicos, como custos menores, manutenção das tradições culturais, a falência do sistema oficial da saúde e a busca por um medicamento com o menor efeito colateral por ser um produto natural.

6. O extrato de *P. gonoacantha*, utilizado no desenvolvimento das formulações dermocosméticas e/ou farmacêuticas de pomada, gel, creme, bálsamo e sabonete, objeto do presente pedido de patente, é destinado ao tratamento de distúrbios infecciosos, com ótima atividade antibacteriana frente a patógenos oportunista ao tecido epitelial como, por exemplo, a espécie *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, apresentando também ação anti-inflamatória, antinociceptiva e cicatrizante. O *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus epidermidis* são considerados patógenos humanos oportunistas e frequentemente estão associados às infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. As infecções mais comuns envolvem a pele (celulite, impetigo, pústulas de acne) e feridas em sítios diversos.

7. Algumas infecções por *S. aureus* são agudas e podem disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite, também podem ocorrer (Brasil, Agência de Vigilância Sanitária. Resistência microbiana. Brasília, 2017. http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm).

8. As formulações, objeto da presente invenção, são destinadas à saúde, utilizam tecnologias e insumos nacionais. Tal iniciativa propiciará a substituição de importações de produtos e insumos, agregando densidade de conhecimento a um produto nacional, aumentando a competitividade do país no cenário global. Desta forma, a presente invenção está alinhada com as diretrizes da Política de Desenvolvimento Produtivo.

9. As formulações requeridas nessa proposta referem-se a produtos capazes de promover qualidade de vida para os pacientes acometidos por lesões, ulcerações e infecções por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As inovações apresentadas nessa proposta referem-se às formulações dermocosméticas e/ou farmacêuticas de pomada, gel, creme, bálsamo e sabonete a base de extratos das folhas, cascas, caules, raízes e flores de *Piptadenia gonoacantha*, com atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antinociceptiva, comprovadas por meio de testes pré-clínicos. Tais formulações visam o tratamento de processos infecciosos, traumáticos e queimaduras, vislumbrando também eficácia cicatrizante. Estudos inéditos comprovam que a planta possui, principalmente em suas folhas, uma constituição fitoquímica rica em compostos capazes de estimular a síntese de colágeno, crucial para o processo de cicatrização. Esses constituintes, presente na *Piptadenia gonoacantha*, possuem atividade cicatrizante, anti-inflamatória, antinociceptiva e antibacteriana. Tais ações se somam favorecendo uma melhor atividade medicinal ao produto final e um ganho de qualidade ao paciente que faz uso do mesmo.

10. Os métodos e técnicas utilizados para o desenvolvimento das composições permitem a elaboração de produtos com alto rendimento e úteis no processo de cicatrização. As composições proporcionam maiores taxas de regressão da área da ferida, quando comparadas a formulações alopáticas, utilizadas como controle. Também foi verificado que as composições contendo extratos de *P. gonoacantha*, proporcionaram uma redução da vascularização, estimulação de fibroblastos e síntese de fibras

colágenas do tipo I, no leito da ferida. A redução da vascularização está diretamente relacionada com a redução no processo inflamatório no tecido cicatricial, fundamental para a cicatrização. O aumento da síntese de colágeno do tipo I permite constatar que as composições contendo extratos de *P. gonoacantha*, promovem maior estimulação de fibroblastos, o que proporciona maior eficácia e redução do tempo de cicatrização.

11. Foram realizados estudos de caracterização farmacobotânica, caracterização fitoquímica, atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antinociceptiva e cicatrizante com o extrato obtido por ultrassonicação e com solvente hidroalcoólico a 80 % (v/v). Esta invenção realiza a extração pelo processo de maceração, com a utilização de solvente álcool 80 % adicionado ácido cítrico (0,3 %) para a obtenção de extrato flavônico com maior preservação dos seus flavonoides, haja vista que são metabólitos secundários que possuem, entre outras atividades, a atividade anti-inflamatória e antibacteriana. Para finalizar a obtenção, o extrato flavônico é submetido ao processo de liofilização, favorecendo o desenvolvimento e produção das formulações.

12. O documento de patente PI 0702480-0, denominado “Uso de extrato de angico-branco (*Piptadenia columbrina*) em formulações cosméticas e farmacêuticas como agente anti-inflamatório e hidratante para a pele”, trata de uma solução inventiva com uma espécie diferente da espécie deste processo. O mesmo ocorre em relação aos documentos BR 10 2014 029031 1, intitulado “Padronização do extrato da casca do angico para produção de formulações dermocosméticas e/ou farmacêuticas com atividade antimicrobiana”, e o de número PI 0800947-3, intitulado “Metabólitos leishmanicidas e inibidores da enzima tripanotiona redutase isolados do fungo endofítico *Cochiliobolus* sp. de *Piptadenia adiantoides*”.

13. Por apresentarem veículos distintos em suas constituições, as composições contendo os extratos de *P. gonoacantha* podem ser utilizadas em combinações, proporcionando melhores resultados ao paciente. Por exemplo, a utilização das composições bálsamo são mais indicadas para

início do tratamento, já a formulação pomada é mais indicada para a continuação e término do mesmo. Além disso, as reações adversas do composto serão minimizadas, visto que se trata de um extrato natural obtido de plantas isentas de toxicidade.

14. Neste contexto, as formulações, objetos da invenção proposta, foram desenvolvidas de modo a levar em conta a utilização de materiais biodegradáveis. Os constituintes do extrato, quando descartados, não acarretarão riscos para o meio ambiente ou mesmo para as pessoas que os manipularem.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

15. Figura 1 – Análises espectrofotométricas do extrato de folhas de *Piptadenia gonoacantha*. A. 6–hidroxicumarina, B. Ácido p-cumárico, C. Ácido Ferúlico, D. Rutina, E. Quercetina, F. Apigenina e G. Canferol.

16. Figura 2 – Atividade antibacteriana do extrato flavônico de *Piptadenia gonoacantha*. H – *Staphylococcus aureus* (ATCC33591); I – *Staphylococcus aureus* (ATCC29213); J – *Staphylococcus epidermidis* (ATCC35984). PgEri – Extrato de *Piptadenia gonoacantha* em DMSO a 20%; DMSO – dimetilsulfóxido, controle negativo, ERI – Eritromicina, controle positivo, ETOH – solução hidroalcoólica a 80%.

17. Figura 3 – Atividade antibacteriana por difusão em ágar das formas farmacêuticas acrescidas de 20% de extrato flavônico de folhas de *Piptadenia gonoacantha*. BálEx – forma farmacêutica bálsamo com 20% de extrato de *Piptadenia gonoacantha* em álcool 80%. EtOH – controle negativo (álcool 80%). CP – controle positivo (clindamicina 50 mg/mL).

18. Figura 4 – Avaliação macroscópica do processo de cicatrização das feridas excisionais e tratamento dos camundongos com formulações pomada, bálsamo a base de extratos de *Piptadenia gonoacantha* ou sulfadiazina de prata. Bal – bálsamo; Pom – Pomada; Sulf – Sulfadiazina de prata (Controle positivo).

19. Figura 5 – Efeito do tratamento com formulações contendo extratos de *Piptadenia gonoacantha* (Bálsamo ou Pomada) ou Sulfadiazina de prata. (K) Área e (L) taxa de contração da ferida em camundongos avaliados no 4º e 8º dias de tratamento. Bal – bálsamo; Pom – Pomada; Sulf – Sulfadiazina de prata (Controle positivo).

20. Figura 6 – Efeitos dos tratamentos no tecido cicatricial dos animais tratados com formulações (pomada e bálsamo) contendo extrato de *Piptadenia gonoacantha* ou sulfadiazina de prata. (M) Celularidade e (N) vascularização no tecido cicatricial. Bal – bálsamo; Pom – Pomada; Sulf – Sulfadiazina de prata (Controle positivo).

21. Figura 7 – Fotomicrografias representativas da celularidade tecidual em cortes de pele de ratos observados ao microscópio de luz. Coloração em H&E, Barras = 200µm. Fragmentos teciduais coletados nos dias 0, 4 e 8 de tratamento com formulações (pomada e bálsamo) contendo extrato de *Piptadenia gonoacantha* ou sulfadiazina de prata. Bal – bálsamo; Pom – Pomada; Sulf – Sulfadiazina de prata (Controle positivo).

22. Figura 8 – Proporção de fibras colágenas do tipo I (O) e tipo III (P) no tecido cicatricial de camundongos avaliados no 4º e 8º dias de tratamento com formulações (pomada e bálsamo) contendo extrato de *Piptadenia gonoacantha* ou Sulfadiazina de prata. Bal – bálsamo; Pom – Pomada; Sulf – Sulfadiazina de prata (Controle positivo).

23. Figura 9 – Fotomicrografias representativas da síntese de colágeno no processo de cicatrização dos animais. Fragmentos teciduais coletados nos dias 0, 4 e 8 de tratamento com formulações (pomada e bálsamo) contendo extrato de *Piptadenia gonoacantha* ou sulfadiazina de prata. Coloração em picrossirius, Barras = 200µm. Bal – bálsamo; Pom – Pomada; Sulf – Sulfadiazina de prata (Controle positivo).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

24. A presente invenção refere-se a formulações produzidas com as partes *in natura*, bem como com os extratos flavônicos, as frações e sub-

frações, obtidos por extração pelos diferentes métodos, da espécie *Piptadenia gonoacantha* com atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antinociceptiva e cicatrizante. A presente invenção refere-se também ao uso das formulações e da *P. gonoacantha* para a produção de agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, antinociceptiva, cicatrizantes e estimuladores da síntese de colágeno.

25. Foram coletadas folhas, cascas, caules, raízes e flores da espécie *P. gonoacantha*, conhecida popularmente como Pau de Jacaré, no município de Viçosa/MG, Brasil. Para a obtenção dos dados sobre a espécie *P. gonoacantha*, tomou-se como base a observação de diferentes indivíduos desta espécie. Foram utilizadas ainda, em paralelo a pesquisa de campo e referências bibliográficas como apoio.

Processo de extração

26. Os extratos de *Piptadenia gonoacantha* são obtidos a partir de suas folhas, cascas, caules, raízes e flores as quais são secas em estufa de ar circulante $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96 horas e trituradas em moinho de facas. O pó obtido é padronizado em peneira de 50 Mesh (0,297 mm de abertura) em que 97% do pó passa por ela e somente 3% pela peneira de 60 Mesh (0,250 mm de abertura), separadamente. Para o preparo do extrato utiliza-se o pó das folhas, cascas, caules, raízes e flores de *Piptadenia gonoacantha* na proporção 1:5 (100g pó : 500mL de solução etanol/água 80% v/v, com 0,3% ácido cítrico), tal proporção perfaz a concentração de 20% de extrato seco (m/v). Novello (Novello, A.A. Extração de antocianinas dos frutos do açaí da mata atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e sua atuação nas atividades antioxidantes e antiaterogênica em camundongos APOE. Tese (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 98. 2011) destaca a importância da presença do agente acidulante ácido cítrico (0,3%) como conservante dos flavonoides durante o processo de extração. Em seguida, submete-se o extrato ao processo de maceração por 72 horas, e posteriormente à filtração a vácuo. O filtrado é

reservado, procedendo-se à extração por mais 2 vezes com o resíduo (torta) obtido no funil. Os filtrados são reunidos ao final do processo em frasco âmbar e ao abrigo da luz para proceder com o processo de liofilização.

Obtenção do extrato liofilizado

27. O extrato flavônico obtido é submetido ao processo de secagem por liofilização, utilizando-se pressão de 10^{-1} m.bar e temperatura de -60°C . Posteriormente, o extrato liofilizado é avaliado quanto à sua constituição fitoquímica e incorporado nas formulações.

Purificação e caracterização fitoquímica do extrato

28. A separação cromatográfica é realizada utilizando coluna de fase reversa C18 250 x 4,6 mm com pré-coluna de mesma natureza. A análise é realizada à temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$), sendo que o modo de eluição isocrático utiliza ácido ortofosfórico (0,1% m/m) como solvente A e acetonitrila como solvente B. As condições de eluição são: 80% A e 20% B (0-60 min), com a vazão da fase móvel de $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (0-60 min), sendo o comprimento de onda utilizado para leitura de 210 nm. As análises por cromatografia líquida foram acopladas à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), onde foram preparadas na concentração 2000 ppm (massa de planta/volume de solvente), as quais foram diluídas até a concentração 500 ppm (massa de planta/volume de solvente). Os resultados obtidos referem-se, portanto, às amostras na concentração 500 ppm e expressos em relação ao LODi (Limite de Detecção do Instrumento) e LOQi (Limite de Quantificação do Instrumento), cujos valores são estimados a partir dos dados obtidos para uma amostra em solvente, na concentração de 25 ng/mL.

29. Para a análise, são verificados os seguintes compostos: Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Catequina, Ácido Vanílico, Ácido Caféico, 6-Hidroxycumarina, Ácido p-Cumárico, Ácido Ferúlico, Rutina, 4-

Hidroxycumarina, Ácido Rosmarínico, Quercitrina, Miricetina, Fisetina, Resveratrol, Ácido trans-Cinâmico, Quercetina, Luteolina, Apigenina, Canferol, 3,6-Dihidroxiavona, Crisina e Galangina.

Preparo das formulações

30. As formulações farmacêuticas contendo o extrato de *Piptadenia gonoacantha*, representam uma solução inventiva baseada na utilização como agente antibacteriano, anti-inflamatório, cicatrizante e antinociceptiva. O requerente solicita a proteção de um produto dermocosmético e/ou farmacêutico que pode apresentar-se na forma de pomada, gel, creme bálsamo e sabonete líquido.

Preparo do extrato liofilizado para incorporação na formulação

31. O extrato final liofilizado, a ser incorporado nas formulações, é suspenso em álcool 80% (v/v), na proporção 1:1 (1g do pó liofilizado para 1g de álcool a 80%). Posteriormente, a solução obtida (50% - m/v) é incorporada nas bases farmacêuticas de pomada, gel, creme, bálsamo ou sabonete líquido, na proporção de 20% em relação ao extrato liofilizado.

Preparo da Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de pomada

32. O extrato obtido é incorporado na concentração de 10 a 30% em relação ao pó liofilizado na base de pomada (Tabela 1). A formulação é constituída por: álcool cetosteárico, monooleato sorbitano etoxilado, vaselina, ácido graxo com poliol éster (Cetiol HE), lanolina anidra, carbamida, metilparabeno, propilparabeno e água desmineralizada (q.s.p.).

Tabela 1. Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de pomada.

Componentes	Quantidade (%)
Extrato de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	10 a 30 %
Álcool cetosteárico 90% e sulfato de cetilesteáril sal sódico	8 a 12 %

10%	
Óleo de amêndoas	5 a 10 %
Lanolina etoxilada	1 a 10 %
Vaselina líquida	5 a 10 %
Vaselina sólida	5 a 10 %
Cera de abelha	3 a 5 %
Água purificada q.s.p.*	100 %

*q.s.p. – quantidade suficiente para.

Modo de preparo da formulação de pomada:

33. Em um béquer, fundir o álcool cetosteárilico 90% e sulfato de cetilesteáril sal sódico 10%, o óleo de amêndoas, a lanolina etoxilada, a vaselina líquida, a vaselina sólida e a cera de abelha. Levar ao aquecimento em banho-maria a uma temperatura aproximada de 70°C (\pm 5°C). Esta fase corresponde à fase oleosa.

34. Em outro béquer, aquecer a água à mesma temperatura (70°C \pm 5°C), que deverá ter seu valor reduzido dos demais componentes, por ser quantidade suficiente para (q.s.p.) completar as 100% da pomada. Essa fase corresponde à fase aquosa.

35. Uma vez aquecida as fases, oleosa e aquosa, a uma temperatura aproximada de 70°C (\pm 5°C), verter a fase aquosa sobre a fase oleosa, agitando até quase ao arrefecimento.

36. Antes da pomada estar completamente resfriada, adicionar o extrato de *P. gonoacantha* na proporção de 10 a 30% em relação ao peso final da formulação.

Preparo da Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de gel

37. O extrato obtido é incorporado na concentração de 10 a 30% em relação ao pó liofilizado na base de gel (Tabela 2). A formulação é constituída por: polímero acrílico, propilenoglicol, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), metilparabeno, imidazolidinil ureia, hidróxido de sódio para acertar pH da base (6,5 – 7,5) e água desmineralizada (q.s.p.).

Tabela 2. Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de gel.

Componentes	Quantidade (%)
Extrato de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	10 a 30 %
Polímero Acrílico	1 a 2 %
Propilenoglicol	5 a 10 %
Ácido etilenodiamino tetra-acético	0,05 a 0,1 %
Metilparabeno	0,02 a 0,3 %
Imidazolidinil ureia	0,25 a 0,3 %
Hidróxido de sódio	Até pH 6,5 – 7,5
Água purificada q.s.p.*	100 %

*q.s.p. – quantidade suficiente para.

Modo de preparo da formulação de gel:

38. Misturar o polímero carboxivinílico 940 (viscosidade 0,5% em água no pH 7,5 é de 40 a 60 pascais-segundo - (Pa s)) no propilenoglicol, após adicionar juntamente ao metilparabeno em água purificada. Deixar repousar por 24 horas, sem mexer. Após esse tempo, homogeneizar e acrescentar o ácido etilenodiamino tetra-acético. Acrescentar o hidróxido de sódio até pH 6,5 a 7,5. Acrescentar o imidazolidinil ureia e homogeneizar.

39. Adicionar o extrato de *Piptadenia gonoacantha* na proporção de 10 a 30% em relação ao peso final da formulação.

Preparo da Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de creme

40. O extrato obtido é incorporado na concentração de 10 a 30% em relação ao pó liofilizado na base de creme (Tabela 3). A formulação é constituída por: propilenoglicol, metilparabeno, ácido etilenodiamino tetra-acético, álcool cetosteárico/monoestearato de sorbitano etoxilado, butilhidroxitolueno, óleo mineral, propilparabeno, ciclometicone volátil e água desmineralizada (q.s.p.).

Tabela 3. Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de creme.

Componentes	Quantidade
-------------	------------

	(%)
Extrato de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	10 a 30 %
Propilenoglicol	3 a 5 %
Metilparabenol	0,02 a 0,3 %
Ácido etilenodiamino tetra-acético	0,05 a 0,1 %
Álcool cetosteárico/Monoestearato de sorbitano etoxilado	12 a 20 %
Butilhidroxi tolueno	0,02 a 0,05 %
Óleo mineral	5 a 10 %
Propilparabeno	0,02 a 0,3 %
Ciclometicone volátil	0,2 a 5 %
Água purificada q.s.p.*	100 %

*q.s.p. – quantidade suficiente para.

Modo de preparo da formulação de creme:

41. Aquecer os componentes propilenoglicol, metilparabeno, ácido tetra-acético e a água purificada a uma temperatura de 75 a 80°C sob agitação constante e suave. Essa fase é a fase denominada de fase aquosa (Fase A).

42. Aquecer os componentes álcool cetosteárico/monoestearato de sorbitano etoxilado, butilhidroxitolueno, óleo mineral e propilparabeno a uma temperatura de 75 a 80°C, sob agitação constante e suave. Essa fase é denominada de fase oleosa (Fase B).

43. Após o aquecimento verter a Fase A na fase B sob agitação vigorosa por 5 minutos. Reduzir a velocidade de agitação, mas a mesma deve ser constante até o resfriamento. Quando a temperatura estiver abaixo de 40°C adicionar o ciclometicone volátil continuando a homogeneização até a temperatura ambiente.

44. Adicionar o extrato de *Piptadenia gonoacantha* na proporção de 10 a 30% em relação ao peso final da formulação.

Preparo da Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de bálsamo

45. O extrato obtido é incorporado na concentração de 10 a 30% em relação ao pó liofilizado na base do tipo bálsamo (Tabela 2). A formulação é

constituída por: pró-vitamina B5 (d pantenol), Óleo de girassol (*Helianthus annus* L), Óleo de copaíba (*Copaifera officinalis* L.), Metilparabeno, Propilparabeno, Butilhidroxitolueno, Óleo de rícino hidrogenado etoxilado, Triglicéride de ácido e cáprico caprílico.

Tabela 4. Preparo da Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de bálsamo.

Componentes	Quantidade (%)
Extrato de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	10 a 30 %
Pró-vitamina B5 (d pantenol)	0,5 a 5 %
Óleo de girassol (<i>Helianthus annus</i> L)	3 a 5 %
Butilhidroxitolueno	0,02 a 0,05 %
Óleo de rícino hidrogenado etoxilado	3 a 5 %
Triglicéride de ácido cáprico caprílico	1 a 5 %
Metilparabeno	0,02 a 0,3 %
Propilparabeno	0,02 a 0,3 %
Álcool cetosteárico 90% e sulfato de cetilesteáril sal sódico 10%	3 a 5 %
Água desmineralizada q.s.p.	100%

*q.s.p. – quantidade suficiente para.

Modo de preparo da formulação de bálsamo:

46. Em um gral triturar o butilhidroxitolueno e o propilparabeno, acrescentando gotas de álcool etílico para solubilizar. Adicionar os óleos de girassol, copaíba, óleo de rícino hidrogenado etoxilado e o álcool cetosteárico 90% e sulfato de cetilesteáril sal sódico 10%. Verter em um béquer e levar ao aquecimento em banho-maria a uma temperatura aproximada de 70°C (\pm 5°C). Essa fase corresponde à fase oleosa.

47. Em um segundo béquer verter a pró-vitamina B5, o metilparabeno, o triglicérides de ácido cáprico caprílico e a água desmineralizada, que deverá ter seu valor reduzido dos demais componentes, por ser quantidade suficiente para (q.s.p) completar as 100 % do bálsamo. Levar ao aquecimento em banho-maria a uma temperatura aproximada de 70°C (\pm 5°C). Esta fase corresponde à fase aquosa.

48. Uma vez aquecidas as fases, oleosa e a aquosa, ambas a uma temperatura aproximada de 70°C (\pm 5°C), verter a fase aquosa sobre a fase oleosa, agitando quase até ao arrefecimento.

49. Antes de o bálsamo estar completamente resfriado, adicionar o extrato de *Piptadenia gonoacantha* na proporção de 10 a 30% em relação ao peso final da formulação.

Preparo da Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de sabonete líquido

50. O extrato obtido é incorporado na concentração de 10 a 30% em relação ao pó liofilizado na base do tipo sabonete líquido (Tabela 5). A formulação é constituída por: laurel éter sulfato de sódio, dietanolamina de ácido graxo de coco, ácido etilenodiamino tetra acético, base perolada, cocoamidopropilbetaína, lanolina etoxilada, glicerina, metilparabeno, propilparabeno, ácido cítrico e água desmineralizada.

Tabela 5. Preparo da Formulação Farmacêutica Contendo *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré) em forma de sabonete líquido.

Componentes	Quantidade (%)
Extrato de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	10 a 30 %
Lauril éter sulfato de sódio	15 a 25 %
Dietanolamina de ácido graxo de coco	2 a 5 %
Ácido etilenodiamino tetra-acético	0,05 a 0,1 %
Glycol distearate	2 a 5 %
Cocoamidopropilbetaína	2 a 5 %
Lanolina etoxilada	1 a 5 %
Glicerina	2 a 10 %
Metilparabeno	0,02 a 0,3 %
Propilparabeno	0,02 a 0,3 %
Ácido cítrico	0,05 a 0,5 %
Água desmineralizada q.s.p.	100%

*q.s.p. – quantidade suficiente para.

Modo de preparo da formulação de sabonete líquido:

51. Pesar a água e acrescentar o EDTA. Adicionar pela ordem e sob agitação suave, porém constante, o lauril sulfato de sódio e a dietanolamina de ácido graxo de coco.
52. Dissolva, separadamente em um béquer, o metilparabeno e o propilparabeno em propilenoglicol e acrescente à mistura anterior.
53. Adicionar na sequência o cocoamidopropilbetaína, a glycol distearate homogeneizando sempre de maneira suave.
54. Ajustar o pH para 6,0 com o ácido cítrico e acertar a viscosidade com cloreto de sódio.
55. Adicionar o extrato de *Piptadenia gonoacantha* na proporção de 10 a 30% em relação ao peso final da formulação.

EXPERIMENTO DE DEMONSTRAÇÃO

Avaliação da atividade microbiológica do extrato flavônico e das formulações contendo o extrato de *Piptadenia gonoacantha*

56. Para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Piptadenia gonoacantha*, bem como das formulações semissólidas, pomada, gel e cremes; e em formulações líquidas, bálsamo e sabonete líquido contendo o mesmo extrato, foram realizados os seguintes procedimentos descritos a seguir:

Preparo do Meio de Cultura e das Bactérias para a realização do ensaio

57. A análise da atividade antibacteriana da espécie *P. gonoacantha* foi realizada através da adaptação do método de difusão em meio sólido com perfuração em ágar. O microrganismo utilizado no teste foi obtido no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia da Universidade Federal de Viçosa - MG. Testes foram realizados com o extrato liofilizado na linhagem de *Staphylococcus aureus* (ATCC33591), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC35984), *Escherichia coli* (ATCC 14948), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) e *Proteus vulgaris* (ATCC 13315).

58. No ensaio foi utilizado o meio de cultura Mueller-Hinton, preparado segundo as especificações do fabricante. A cultura de bactérias foi mantida a 4°C em Mueller-Hinton. Antes dos testes, a linhagem foi repicada para o meio citado e incubada a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. A partir de cultura recente, foi preparada suspensão bacteriana em solução salina NaCl 0,9% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL) (NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards; Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard M7-A6, 2nd ed., 2003). O controle da absorbância desta suspensão de microrganismos foi realizado, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 600 nm.

59. Posteriormente, 500 µL da suspensão do microrganismo foi misturada ao meio Mueller-Hinton estéril, em estado líquido (12,5 mL) a 37°C, sendo em seguida vertido em placas de petri estéreis (diâmetro 90mm). Os poços foram confeccionados utilizando-se uma bomba a vácuo acoplada a uma ponteira estéril previamente adaptada para tal fim. Em cada placa foram perfurados poços para aplicação do extrato e suas respectivas frações, bem como poços para aplicação do controle positivo e para o controle negativo, separadamente.

60. Foram depositados 10 µL do extrato, suas diluições e dos controles positivo (clindamicina 50 mg/mL) e negativo (álcool 80%) nas cavidades correspondentes a cada uma. Após a incubação por 24 horas, em estufa a 37°C, o diâmetro do halo de inibição foi mensurado em mm, sendo os resultados organizados e descritos.

61. Para a avaliação da atividade antibacteriana das formulações foram perfurados poços para o produto a ser aplicado (base + extrato), um para o controle positivo (clindamicina 50 mg/mL), um para o extrato na concentração utilizada na formulação (20% diluído em álcool), um para o álcool 80% e outro para o controle negativo (base das formulações sem o extrato de *Piptadenia gonoachanta*). As quantidades depositadas dos

controles e dos produtos foram de 10 µL. Após a incubação por 24 horas, em estufa a 37°C, o diâmetro do halo de inibição foi mensurado em mm, sendo os resultados organizados e descritos.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Caracterização do extrato da espécie *Piptadenia gonoacantha*

62. O extrato submetido à análise de caracterização apresentou entre vários componentes, aqueles que são classificados como flavonoides, que foram exatamente os compostos de interesse por apresentarem, segundo Nijveldt et al (Nijveldt, R.J., Nood, E.V., Hoorn D.V., Boelens P.G., Norren, K.V., Leeuwen P.V. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74, pp. 418–425), atividade antimicrobiana, ação antioxidante, de proteção da radiação UV entre outras.

63. É possível observar a concentração considerável de rutina (Tabela 6, Figura 1). Este flavonoide tem sido relatado por muitos pesquisadores por ser encontrado nas espécies vegetais de grande interesse farmacológico para saúde humana, além de possuir muitas propriedades biológicas, sendo reportado como antialérgico, anti-inflamatório, antitumoral, antibacteriano, propriedades antiplaquetárias, antiespasmódico, antivirais, antiulcerogênico, antidiarreico, vasodilatador, citoprotetora, antihipertensivo, antimutagênico, proteção da lesão hepatocelular e atividade antioxidante pela eliminação de espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila (OH[•]), ânion radical superóxido (O₂^{•-}) e radical peróxido (R-O-O[•]) (Oliveira, 2015; Caillet et al., 2007; Jiang et al., 2007; Calabrò et al., 2005; Domitrovic et al., 2012; Janbaz et al., 2002; Mahmoud, 2012; Yang et al., 2008).

64. Devido à alta concentração deste metabólito elucidado, utilizaremos o mesmo como um marcador biológico e no controle da qualidade durante a produção das formulações.

Tabela 6. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) do extrato hidroalcoólico 80% de *P. gonoacantha*.

Composto	Resultado (ng/mL)	Composto	Resultado (ng/mL)
Ácido Gálico	< LODi	Quercitrina	7,4
Ácido Clorogênico	< LODi	Miricetina	< LODi
Catequina	< LODi	Fisetina	> LODi < LOQi
Ácido Vanílico	< LODi	Resveratrol	< LODi
Ácido Caféico	< LODi	Ácido trans-cinâmico	< LODi
6-Hidroxicumarina	1,9	Quercetina	< LODi
Ácido p-Cumárico	10,5	Luteolina	> LODi < LOQi
Ácido Ferúlico	11,6	Apigenina	2,2
Rutina	33,4	Canferol	7,6
4-Hidroxicumarina	< LODi	3,6-Dihidroxiavona	< LODi
Ácido Rosmarínico	< LODi	Crisina	< LODi
Galangina	< LODi	N/A	N/A

Atividade antibacteriana

65. O extrato liofilizado de *P. gonoacantha* apresentou halos de inibição frente a *S. aureus* (ATCC33591) igual a 1,3 cm, apresentando eficácia relativa ao controle positivo (Figura 2). Das formulações avaliadas, o bálsamo contendo o extrato de *P. gonoacantha* apresentou dados que permitem concluir que houve a continuidade da atividade antibacteriana *in vitro*, mantendo a atividade verificada anteriormente nos ensaios realizados apenas com os extratos, embora com halo de inibição um pouco menor, 1,0 cm (Figura 3). Por outro lado, a formulação na base pomada, como descrita anteriormente, não apresentou halos de inibição superiores a 1,0 cm, como verificado na formulação bálsamo. Possivelmente, a redução da atividade obtida com a formulação na base bálsamo e pomada em relação à atividade antibacteriana obtida com o extrato esteja relacionada com a viscosidade dos produtos no meio de crescimento bacteriano. Entretanto, esta redução da atividade pode apenas estar relacionada à técnica utilizada na avaliação *in vitro* e não ser verificada *in vivo*.

66. A quantificação de fenóis totais nos extratos de *Piptadenia gonoacantha* indicou que grande proporção dos extratos é constituída por

compostos incluídos nesta classe, sendo confirmada pela caracterização do extrato que permitiu evidenciar a presença de vários flavonoides e também outros compostos como compostos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmicos como o ácido felúrico, cumarinas (6-hidroxycumarina e ácido p-cumárico) e flavonoides (rutina, quercetina, apigenina e canferol). O extrato apresentou atividade antibacteriana, tendo eficiente capacidade de inibir o crescimento da bactéria *S. aureus*, uma espécie altamente virulenta e com altas taxas de resistência. Os dados obtidos sugerem que a espécie *P. gonoacantha* possui compostos promissores como fonte para obtenção de novos medicamentos no combate a microrganismos resistentes.

Avaliação da atividade cicatrizante de *Piptadenia gonoacantha*

Animais

67. Foram utilizados 30 camundongos (Balb C) machos, com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. O número de animais foi definido em função das análises estatísticas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno higienizadas diariamente em temperatura controlada (22-24°C) e ciclo luz/escuro de 12 horas. Ao longo do experimento os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*. Durante os primeiros 15 dias os animais ficaram em processo de adaptação na área experimental. Após o experimento os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação animal da UFV, sendo as carcaças recolhidas pelo serviço de biossegurança da Universidade Federal de Viçosa.

Incisão Cirúrgica e Tratamentos dos animais

68. Após a aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa, as feridas experimentais foram realizadas pelo método cirúrgico, mediante prévia anestesia dissociativa, pela associação de cloridrato de xilazina na posologia de 8,0 mg.kg⁻¹, com cloridrato de ketamina na posologia de 140 mg.kg⁻¹, via intraperitoneal. Após

a anestesia, foram feitas a tricotomia e antissepsia com clorexidine a 2%. Com um bisturi circular de 6 mm foi realizada uma incisão por meio de remoção da pele da região dorsal, segundo metodologia proposta por Carvalho (Carvalho GD. 2013. 91f. Efeito da ingestão de água-de-coco e água magnetizada na reparação de feridas experimentais em coelho. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG). Avaliação da ferida foi realizada diariamente por meio de avaliação visual e paquímetro manual. Foi observando possíveis alterações clínicas como: sinais de inflamação, halo eritematoso, tempo de epitelização e tempo de cicatrização. As feridas foram mantidas abertas, sem nenhuma manipulação local, somente a aplicação dos tratamentos.

69. Foram realizados 3 tratamentos com 6 repetições conforme descrito a seguir:

70. A) Tratamento com pomada contendo extrato de *Piptadenia gonoacantha*;

71. B) Tratamento com bálsamo contendo extrato de *Piptadenia gonoacantha*;

72. C) Tratamento com sulfadiazina de prata, utilizada como controle positivo.

73. No primeiro dia experimental, foi realizado uma ferida cirúrgica no dorso dos animais, sendo este fragmento chamado de Tempo “0” ou primeiro dia. Foram coletadas amostras das feridas no 4º e 8º dia. O tratamento iniciou imediatamente após a lesão e sendo a aplicação dos tratamentos realizados uma vez por dia durante todo o experimento.

Avaliação das feridas

74. As feridas foram avaliadas macroscopicamente com uso de paquímetro manual, em duas direções: o maior comprimento e a maior largura mensurado no 1º, 4º e 8º dias após confecção das feridas.

Coleta e Processamento do material

75. As análises histopatológicas dos fragmentos teciduais foram realizadas no laboratório de patologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. No 4º e 8º dia de tratamento, 6 animais de cada grupo foram eutanasiados e, uma incisão cirúrgica com auxílio de bisturi circular (6 mm) realizada para a retirada do fragmento tecidual destinado à análise histopatológica.

76. Os fragmentos teciduais retirados, foram imediatamente fixados isoladamente em solução contendo formaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 24 horas e, posteriormente, por 48 h em álcool 70% até a confecção das lâminas histológicas. Em seguida, foram utilizados processos histológicos rotineiros para inclusão em parafina seguindo as seguintes etapas: desidratação em álcool (70%, 80%, 90%, 100%, sendo neste último 3 vezes), diafanização (xilol I, II, III), infiltração (parafina histológica I, II, III) e, posteriormente, emblocamento. Foram obtidos cortes de 4 micrometros em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany) os quais foram corados com picrosirus (para diferenciação das fibras colágenas do tipo I e III sob microscopia de polarização) e hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de fibroblasto, vasos e células inflamatórias.

77. As lâminas coradas com HE foram visualizadas usando microscópio de luz conectado a uma câmera digital (QI). Usando uma lente objetiva de 20X, dez campos de cada lâmina foram fotografados aleatoriamente, fazendo uma área total tecidual de $7,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ submetido à análise estereológica. Análise do colágeno foi baseada na propriedade de birrefringência das fibras de colágeno, uma vez que sob a polarização, as fibras colágenas mais espessas (colágeno tipo I), aparecem em tons de cores brilhantes que vão do vermelho ao amarelo, ao passo que as fibras reticulares delgadas (colágeno tipo III) aparecem em verde brilhante. A análise estereológica foi realizada utilizando o software especializado.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Caracterização do extrato da espécie *Piptadenia gonoacantha*

78. Estudos preliminares com os extratos da espécie *Piptadenia gonoacantha*, realizados pela equipe desenvolvedora, têm demonstrado a presença de compostos fenólicos, flavonoides e cumarinas em sua constituição. Dentre eles, destaca-se a presença de rutina ($33,4 \text{ ng.mL}^{-1}$), ácido Ferúlico ($11,6 \text{ ng.mL}^{-1}$), ácido p-cumárico ($10,5 \text{ ng.mL}^{-1}$), quercitrina ($7,4 \text{ ng.mL}^{-1}$), entre outros. Esses compostos são reconhecidos na literatura por possuírem atividades biológicas de grande interesse medicinal, como: atividade antimicrobiana, antioxidante, fotoprotetora, cicatrizante, entre outras.

79. Como exemplo da grande possibilidade de utilização e aplicação dos metabolitos verificados na espécie, ressaltamos a presença de rutina. Suas concentrações consideráveis nos extratos obtidos chamam atenção para a espécie em estudo. Este flavonoide tem sido relatado por muitos pesquisadores por ser encontrado nas espécies vegetais de grande interesse farmacológico para saúde humana, além de possuir muitas propriedades biológicas, sendo reportado como antialérgico, anti-inflamatório, antitumoral, antibacteriano, propriedades antiplaquetárias, antiespasmódico, antivirais, antiulcerogênico, antidiarreico, vasodilatador, citoprotetora, antihipertensivo, antimutagênico, proteção da lesão hepatocelular e atividade antioxidante pela eliminação de espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila (OH^{\cdot}), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e radical peróxido (R-O-O^{\cdot}) (Oliveira, 2015; Caillet *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Calabrò *et al.*, 2005; Domitrovic *et al.*, 2012; Janbaz *et al.*, 2002; Mahmoud, 2012; Yang *et al.*, 2008).

80. Devido à alta concentração deste metabólito elucidado, utilizou-se o mesmo como um marcador biológico e no controle da qualidade durante a produção dos extratos, formulações e/ou preparações farmacêuticas.

Avaliação clínica dos animais e histopatológica do processo de cicatrização das feridas

81. Neste estudo, o tempo experimental total escolhido foi de 8 dias, baseado em estudos prévios. Durante todo o período experimental, as feridas não apresentaram sinais macroscópicos de infecção nos grupos analisados (Figura 4). A partir do segundo dia de tratamento, houve formação de uma crosta nas feridas em todos os grupos avaliados. Também não foi constatada perda de peso dos animais após os primeiros dias da incisão cirúrgica e nem durante o experimento. A figura 5, K apresenta os valores da área (expressa em mm^2) e o índice de contração das feridas (expresso em %) cirúrgicas dos animais tratados com bálsamo (Bal) ou pomada (Pom) contendo extrato de *P. gonoacantha* ou sulfadiazina de prata (Sulf).

82. No 4º dia de tratamento, os grupos tratados com Sulf e Bal, apresentaram as maiores taxas de regressão da área da ferida, 44,4% e 45,4%, respectivamente (Figura 5, L). No 8º dia de experimento, as maiores porcentagens de regressão da ferida foram obtidas nos grupos pomada (81,6%), seguida pelos grupos Sulf (76,8%) e Bal (60,7%). Estes dados revelam que os animais tratados com Bal proporcionam o fechamento da ferida em menor tempo (4º dia de tratamento), quando comparado ao Pom e Sulf (Controle). Entretanto, o tratamento com a Pom contendo *P. gonoacantha*, foi capaz de reduzir a área da ferida em 81,6%, sendo mais eficaz que os demais tratamentos ao 8º dia, seguido por Sulf (76,8%) e Bal (60,7%) (Figura 5, L). Esses resultados permitem concluir que o tratamento Bal contendo extrato de *P. gonoacantha*, proporciona maior velocidade no processo de cicatrização logo nos primeiros dias de tratamento. Já o tratamento com a pomada de *P. gonoacantha* se mostra mais eficaz após o 4º dia de tratamento. Ou seja, tanto o tratamento Bal e Pom contendo extrato de *P. gonoacantha* são superiores ao tratamento controle, Sulf. Porém, em fases diferentes, sendo o bálsamo útil para início do tratamento e a pomada para a continuação e término do mesmo. Essa observação é de suma importância, pois a redução no tempo de tratamento é fundamental

para a qualidade de vida dos pacientes e redução com gastos com o tratamento.

83. A sulfadiazina de prata é uma sulfonamida de aplicação tópica que tem ação contra vários microrganismos gram-negativos, gram-positivos e *Candida albicans*. Sua atividade antimicrobiana promove rompimento da célula por efeito da pressão osmótica, devido ao enfraquecimento da membrana e da parede celular microbiana, resultando em sua ação bactericida. Além disso, a reação do íon prata com o DNA microbiano impede a replicação da bactéria, resultando no efeito bacteriostático. As sulfonamidas são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA), impedindo que o mesmo seja utilizado para síntese de ácido fólico. O ácido fólico, também conhecido por folato, é uma vitamina importante para a síntese de precursores de DNA e RNA em bactérias e mamíferos. No entanto, as bactérias precisam sintetizá-lo por não conseguirem absorver o composto pré-formado, diferentemente dos mamíferos.

84. Todos os tratamentos apresentam resultados superiores e estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao número de células totais (Figura 6, M), encontradas no tecido retirado no primeiro dia, denominado controle. Entretanto, não diferiram estatisticamente entre si, nos primeiros 4 dias de tratamento. Embora, resultados estatísticos significativos não foram observados neste período, os dados demonstraram um aumento da celularidade em 8,10% e 9,73% com os tratamentos Bal e Pom, respectivamente, em relação ao controle Sulf. Quando se avalia a celularidade tecidual (Figura 6, M e Figura 7) ao 8º dia experimental, percebe-se um aumento no número de células, estatisticamente significativo, nos animais tratados com Bal em relação aos grupos Pom ($p < 0,0001$) e Sulf ($p < 0,001$). A diferença observada demonstrou por meio dos dados que o processo cicatricial proporcionado pelo uso do tratamento Bal pode ser favorecido pelo aumento no número celular.

85. Em relação à vascularização tecidual (Figura 6, N e Figura 7), todos os tratamentos proporcionaram um aumento na vascularização e diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo denominado controle, pele integra. Entretanto, não foi verificada diferença estática significativa entres os tratamentos Bal, Pom e Sulf, nos quatro dias iniciais. Contudo, no 8º dia, houve redução da vascularização no tecido tratado com Bal ($p < 0,01$) e Pom ($p < 0,001$), não diferindo entre si, mas sendo estaticamente diferentes quando comparados ao controle Sulf (Figura -6,N e Figura 7). A redução da vascularização observada no tecido tratado com Bal e Pom reflete uma redução no processo inflamatório no tecido cicatricial. Esta redução é fundamental para que dê início à fase proliferativa permitindo a continuação do processo de cicatrização. Para confirmar estas observações, relativo às fases da cicatrização, nosso grupo de pesquisa analisou e quantificou a produção de colágeno no tecido cicatricial (Figuras 8 e 9). Por meio dos resultados, não foram observados diferença estatisticamente significativa, entre todos os tratamentos, quanto à síntese de colágeno tipo III. Entretanto, o tratamento Bal proporcionou um aumento das fibras colágenas tipo III, em valores absolutos, quando comparado aos grupos controle (51,1%), Sulf (68,1%) no 4º dia e Sulf (59,5%) no 8º dia de tratamento (Figura 8,P e figura 9).

86. Quando analisamos a síntese de colágenos do tipo I, fundamental para o processo de cicatrização, verificamos um aumento expressivo nos tratamentos com Bal e Pom em relação aos grupos controle e Sulf (Figura 8, O e figura 9). O tratamento Bal, proporcionou aumento das fibras colágenas do tipo I, estatisticamente significativo em relação ao tratamento Sulf ($p < 0,0001$) e ao controle ($p < 0,001$), tecido integro. Por meio dos dados, pode-se inferir que os compostos bioativos do extrato de *P. Gonoacantha*, presentes nas formulações Bal e Pom, promoveram proliferação e maturação de fibroblastos, bem como a síntese de colágeno do tipo I.

87. O tratamento com as formulações bálsamo ao 4º dia e Pomada ao 8º dia de tratamento, ambas contendo extrato de *P. gonoacantha*,

apresentaram as maiores taxas de regressão da área da ferida, 45,4% e 81,6%, respectivamente, em relação ao grupo controle (sulfadiazina de prata). Os tratamentos Bal e Pom proporcionaram uma redução da vascularização indicando uma redução no processo inflamatório, dando início à fase proliferativa no tecido cicatricial. Esses dados foram apoiados pela análise da síntese de colágeno, onde os tratamentos Bal e Pom promoveram maior estimulação de fibroblastos e síntese de fibras colágenas do tipo I.

88. Em suma, os resultados revelaram a eficácia das formulações Bálsamo e Pomada em relação a Sulfadiazina de prata. Porém, com indicações em fases distintas, sendo o bálsamo útil para início do tratamento e a pomada para a continuação e término do mesmo. Esta observação é de suma importância, pois a redução no tempo de tratamento é fundamental para a qualidade de vida dos pacientes e redução com gastos no tratamento.

89. A sulfadiazina de prata é um fármaco sintético constituído por metal pesado (Ag) que podem deixar resíduos acumulados no tecido. Já as formulações Bálsamo e Pomada são produzidas a base de um extrato natural, oriundo da espécie *P. gonoacantha* e sua formulação reconhecidamente atóxica.

CONCLUSÃO

90. Considerando os compostos naturais encontrados no extrato de *P. gonoacantha*, a presente proposta objetiva o desenvolvimento de um produto destinado à saúde, utilizando tecnologias e insumos nacionais, cuja produção poderá ser realizada inteiramente no país. Tal iniciativa propiciará a substituição de importações de produtos e insumos, agregando densidade de conhecimento a um produto nacional, aumentando a competitividade do país no cenário global, com o objetivo de ampliar as possibilidades de recursos terapêuticos de baixo custo destinado ao SUS, para o tratamento de processos infecciosos e inflamatórios cutâneos e cicatriciais.

Reivindicações

1. **Uso do extrato de *Piptadenia gonoacantha*** caracterizado por ser para a produção de agentes dermocosméticos e farmacêuticos com atividades antimicrobiana, cicatrizante e estimuladora da síntese de colágeno.

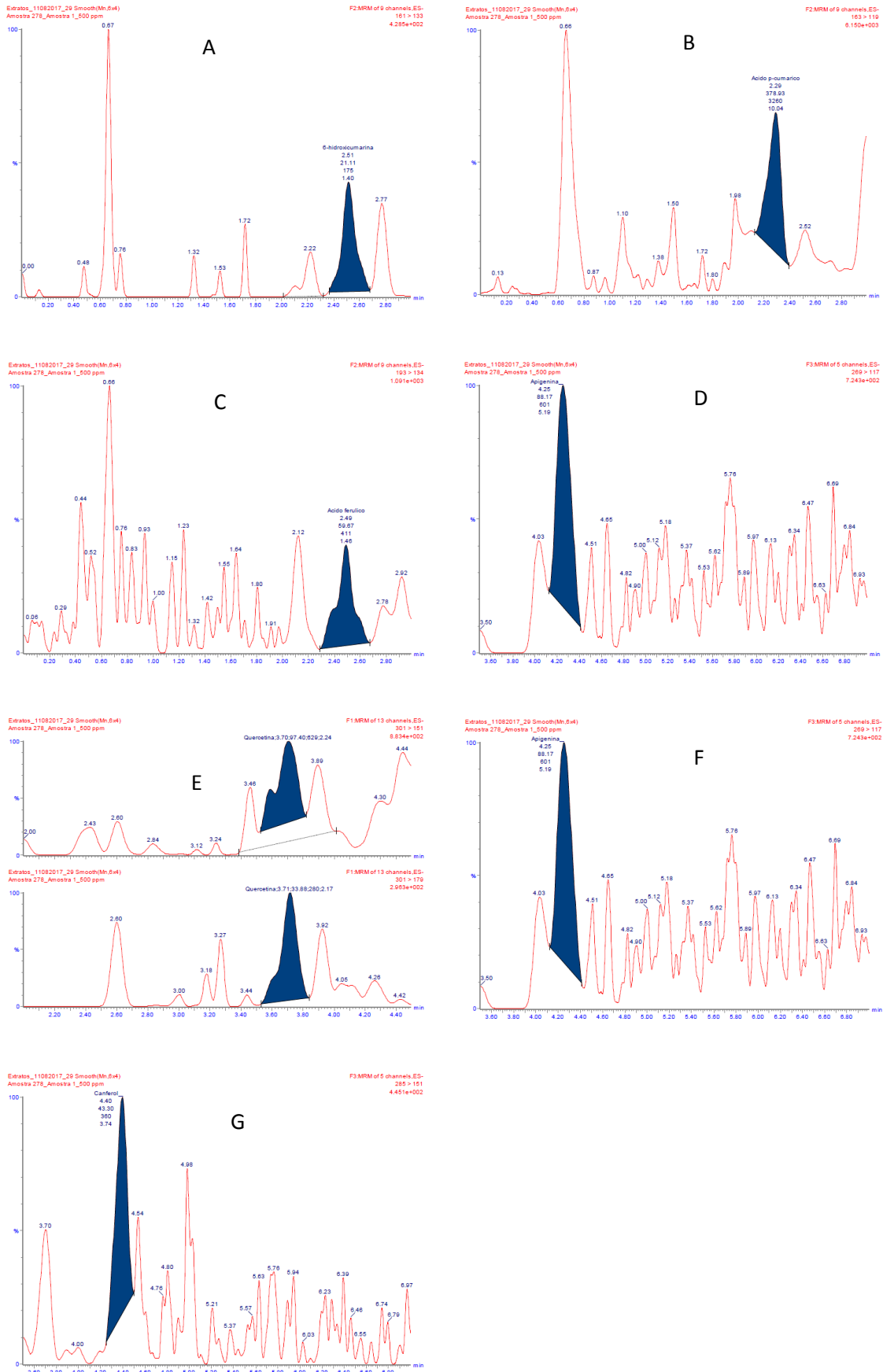


Figura 1

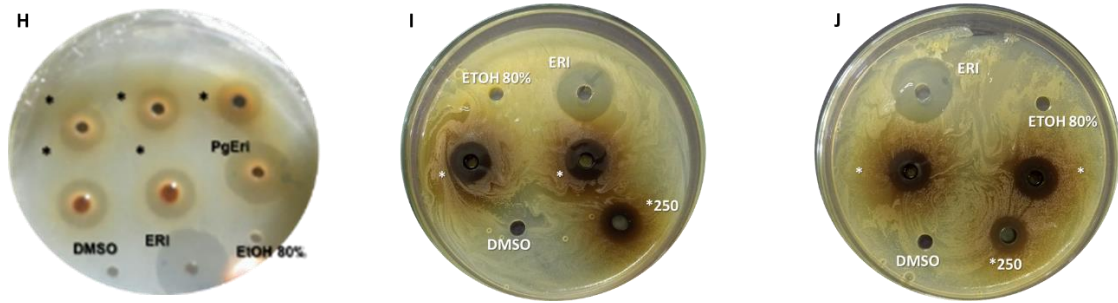


Figura 2

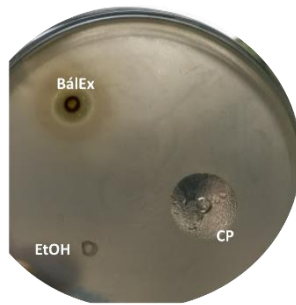


Figura 3

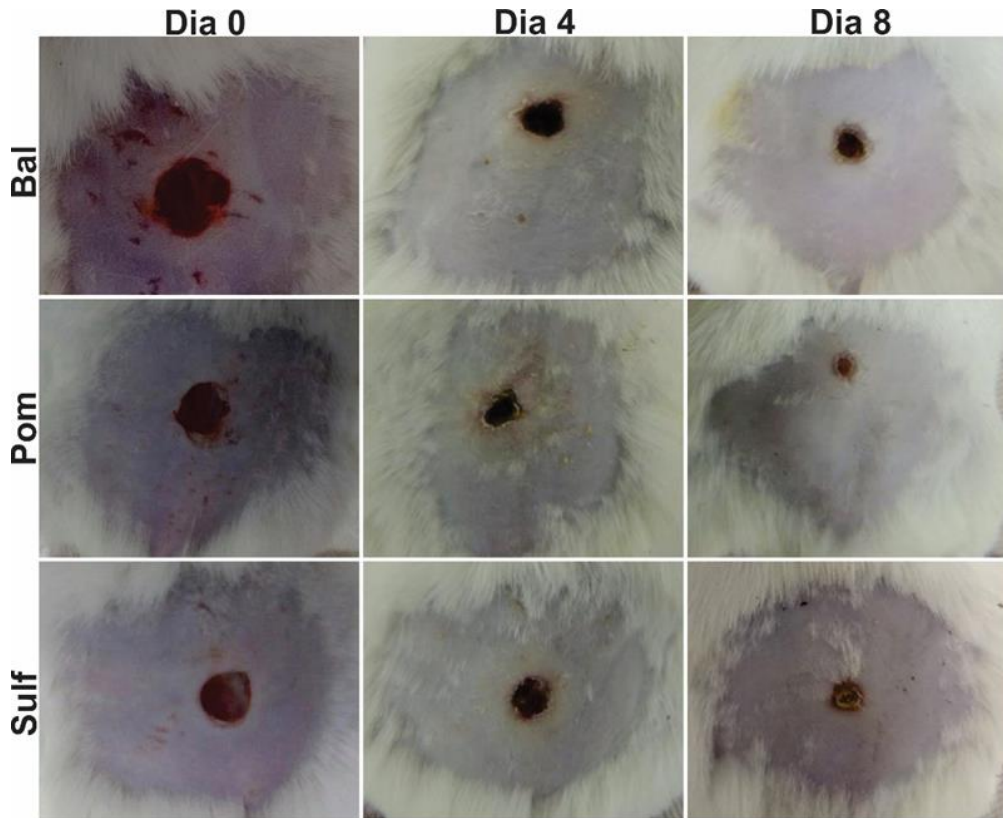


Figura 4

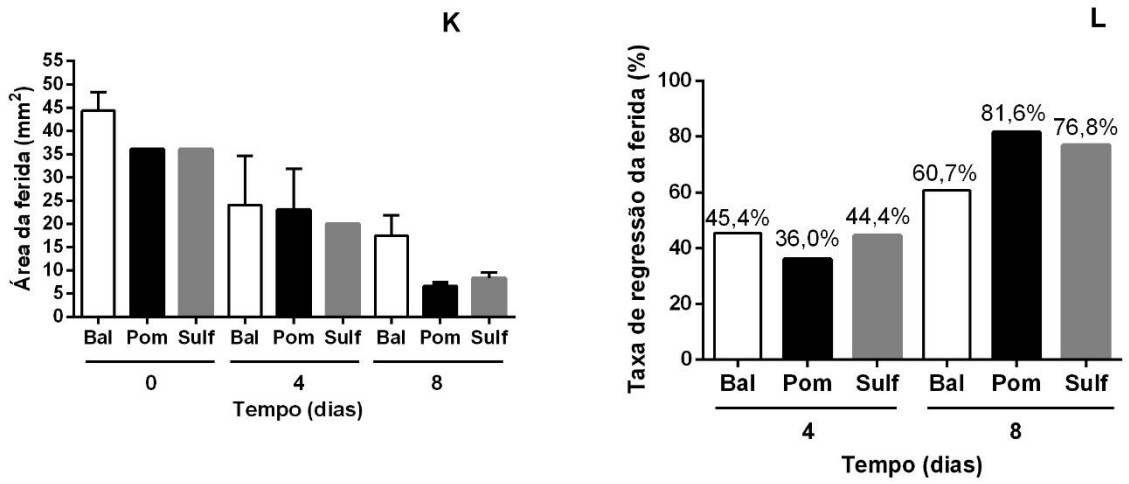


Figura 5

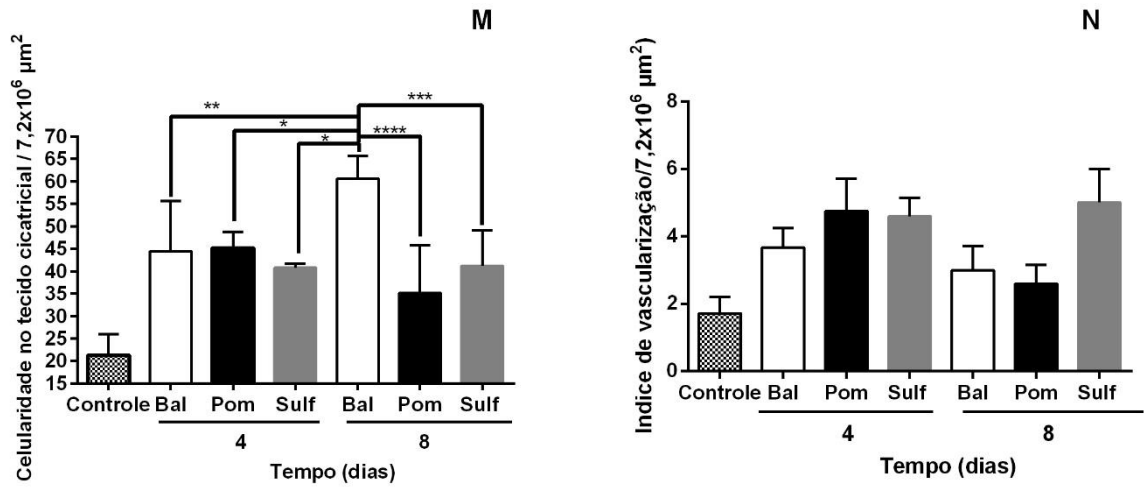


Figura 6

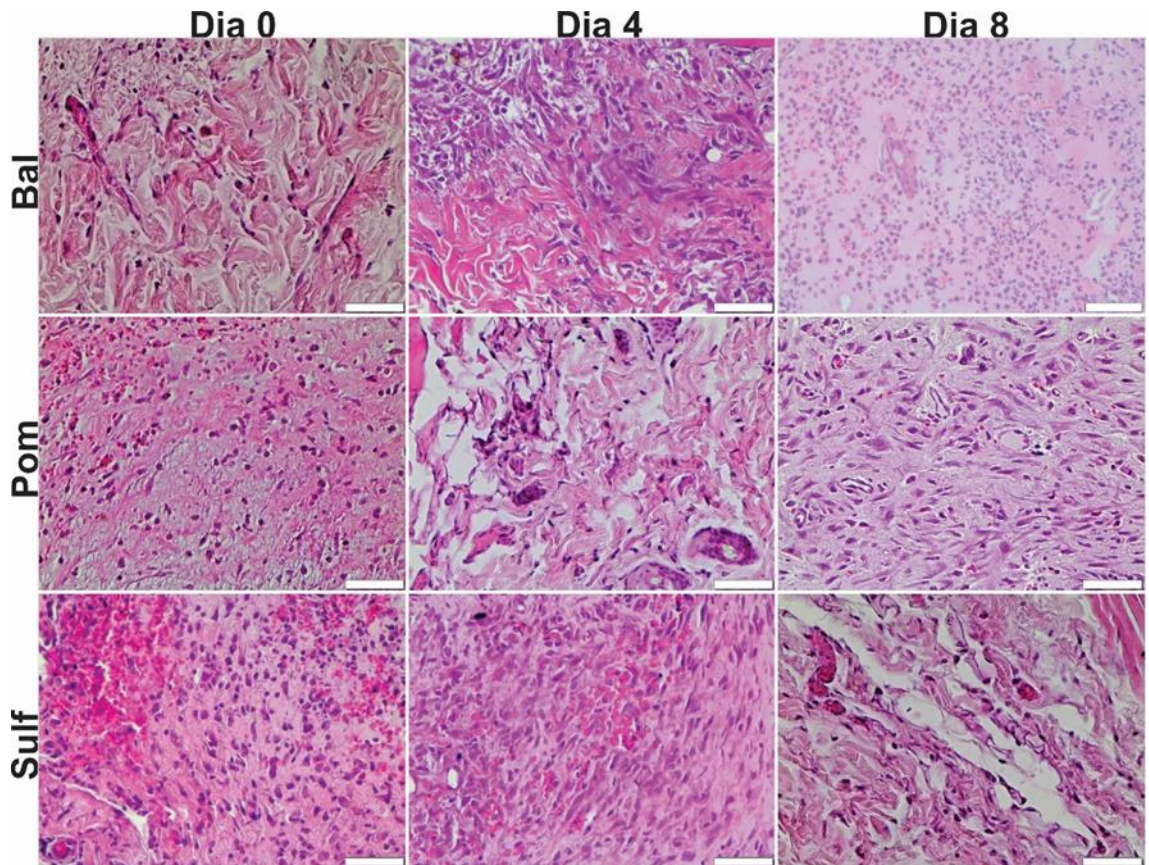


Figura 7

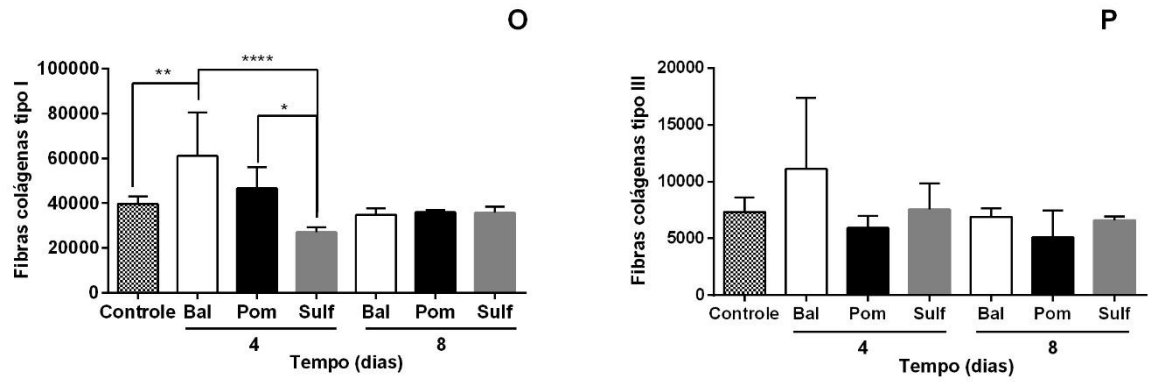


Figura 8

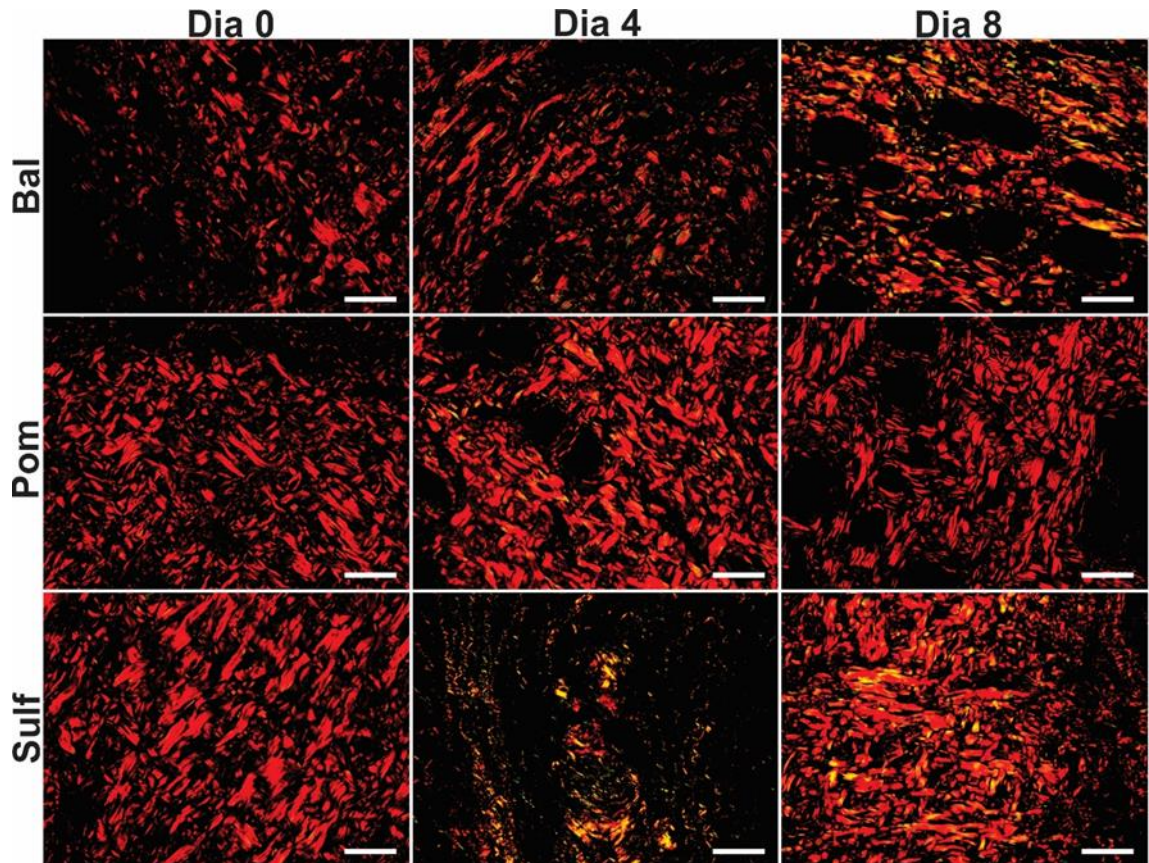


Figura 9