



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

(21) BR 102018077212-0 A2



(22) Data do Depósito: 27/12/2018

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

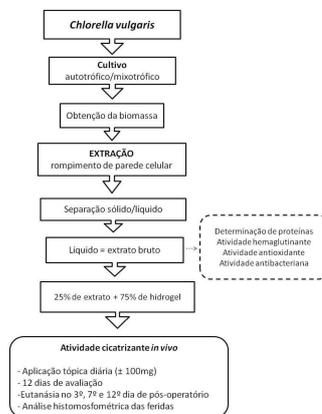
(54) **Título:** FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA

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

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

(72) **Inventor(es):** ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; RAQUEL PEDROSA BEZERRA; DANIELA DE ARAUJO VIANA MARQUES; ALEXSANDRA FRAZAO DE ANDRADE; REBECA GONCALVES DE MELO; POLYANNA NUNES HERCULANO; VALDEMIRO AMARO DA SILVA JUNIOR; MARIA HELENA MADRUGA LIMA RIBEIRO; JOSE LUIZ DE LIMA FILHO; ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA.

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA. A presente patente de invenção refere-se à forma farmacêutica gel à base do extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* para o tratamento cicatrizante de feridas cutâneas em geral, particularmente feridas incisivas. A microalga foi cultivada em meio de cultivo autotrófico ou, preferencialmente, mixotrófico com a adição de um ou mais subproduto e/ou resíduo agroindustrial rico em proteínas. A biomassa microalgal obtida do cultivo foi concentrada e a parede celular rompida em solução aquosa, obtendo uma fração sólida e uma líquida. A fração líquida, denominada de extrato bruto, foi utilizada para a preparação do formulado em gel. O efeito cicatrizante do gel foi comprovado a partir do sétimo dia de tratamento em camundongos saudáveis. O produto é de fácil obtenção e aplicação e consegue produzir resultados eficazes na regeneração celular, em tempo inferior ao observado no tratamento convencional à base de outros medicamentos disponíveis no mercado. Ademais, os bioativos presentes no produto não precisam ser purificados para realizarem sua ação cicatrizante. Este produto tem aplicação na área da Biotecnologia e farmacêutica que visa, principalmente, resultados mais rápidos e eficientes na cicatrização e reconstituição tissular.



“FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO
EXTRATO DE MICROALGA”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] O presente relatório de invenção trata de uma formulação em gel contendo extrato aquoso cicatrizante obtido através do extrato da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* com ação cicatrizante de lesões cutâneas para uso tópico, com aplicação nas áreas clínicas, terapêuticas e farmacêuticas. É um método mais rápido, fácil e econômico quando comparado a outros produtos utilizados, possibilitando uma reepitelização a partir do sétimo dia de tratamento, estando no campo da biotecnologia e farmácia.

Antecedentes da invenção

[002] Os produtos disponíveis no mercado, que têm sido utilizados na gestão e no tratamento de enfermidades humanas ao longo dos anos, geralmente são à base de plantas. Apesar da importância desses produtos, sua utilização geralmente ocorre de forma empírica, onde muitas vezes não segue os padrões de qualidade (TUROLLA & NASCIMENTO. Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 289-206, 2006), pode ter uma eficácia baixa, os efeitos colaterais diversos são frequentemente associados, além de requerer maior área para plantação e depender das condições climáticas. Os efeitos colaterais podem ser alergias, maior tempo de cicatrização, hemorragia no tecido e queimaduras na pele. Mesmo assim, o uso de cicatrizantes naturais *in natura* ou como fitoterápicos supera o uso dos convencionais pelo seu fácil acesso e menor custo. Além disso, um só tipo de tratamento não preenche os requisitos para ser aplicado em todos os tipos de feridas cutâneas, uma vez que deve ser adequado à natureza, à localização e ao tamanho da ferida. Dessa maneira, a busca por outros agentes naturais surge como uma alternativa para o tratamento dessas enfermidades (BUDOVSKY et al., Wound Repair and Regeneration, v. 23, n. 2, p. 171–83, 2015).

[003] A utilização de compostos bioativos derivados de algas e microalgas, torna-se interessante para o tratamento de enfermidades devido às suas propriedades biológicas, a baixa toxicidade e elevada disponibilidade (NASCIMENTO-NETO et AL Marine Drugs, v. 10, n. 9, p. 1936-1954, 2012; KORDJAZI et al., Int. J. Mol. Cell Med., v. 2 n. 4, p. 156-163, 2013). Assim, biomoléculas ativas presentes em micro-organismos fotossintetizantes podem ser uma potencial terapia dessas enfermidades, principalmente os micro-organismos fotossintetizantes GRAS (*generally recognized as safe*) como a *Chlorella vulgaris*.

[004] Os micro-organismos fotossintetizantes são ricos em ácidos graxos essenciais, proteínas, carotenoides, polissacarídeos, vitaminas, enzimas e outros compostos, sendo fontes de bioativos e produtos biotecnológicos (BATISTA et al., Algal Res., v. 2, p. 164–173, 2013). Essas substâncias podem contribuir com atividades biológicas, devido aos seus compostos conterem propriedades farmacológicas, como redução de inflamações, regulação das expressões gênicas para alterar atividades celulares, como: migração celular, deposição de matriz extracelular e o sucesso final da regeneração tecidual (ZHANG et al., Phytomedicine, v. 20, p. 9–16, 2012).

[005] Extratos da microalga *Chlorella vulgaris* são ricos em aminoácidos essenciais, vitaminas, ácidos graxos essenciais, minerais polissacarídeos (SAFI et al., Energy Ver., v. 35, p. 265-278, 2014) e pigmentos antioxidantes, tais como β -catoreno, luteína e clorofila (LI et al., J. Agric. Food Chem., v. 50, n. 5, p. 1070-1072, 2002) que podem atuar como imunoestimuladores e antioxidantes (WANG et al., Process Biochem., v. 45, p. 1865-1872, 2010).

[006] Dentre outras atividades bioativas descritas na literatura, podemos citar antidiabética, antimicrobiana, antitumorais, anti-inflamatória (PIETRAMAGGIORI et al., J. of Trauma and Acute Care Surgery, v. 64, n. 3, p. 803–808, 2008; SILVA et al., Ann Microbiol. Res., v. 1, n. 1, p.9-19, 2017). Estudos anteriores realizados com microesferas obtidas a partir do extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* demonstraram atividade cicatrizante (BARI et al., Materials, v. 10, p. 983, 2017). A utilização de extrato metanólico dessa microalga demonstrou atividade antibacteriana para gram-negativas, bem como a inibição de proteínas anti-apoptóticas de células tumorais (JAYSHREE et al.,

Indian J. Pharm. Sci, v. 78 n. 5, p. 575-581, 2016). Relatos na literatura também associam comprimidos de extratos de *Chlorella vulgaris* as melhorias dos sintomas físicos e cognitivos da depressão devido a redução do estresse oxidativo na fisiologia (PANAHI et al., *Complementary Therapies in Medicine*, v.23, p. 598–602, 2016). Além disso, pesquisas apontam que o extrato metanólico dessa microalga, como fonte de compostos, pode ser utilizado para inibição de mediadores pró-inflamatórios (SIBI & RABINA, *Pharmacognosy Res.*, v.8, n.2, p. 118-122, 2016).

[007] Os micro-organismos fotossintetizantes são micro-organismos com baixa exigência nutricional para seu crescimento celular, necessitando basicamente de água, CO₂, intensidade luminosa e alguns sais minerais (BERTOLDI et al., *Ciência Rural*, v. 38, n. 1, p. 54-58, 2008; ORTENZIO et al., *Bioenergia em revista: diálogos*, ano 5, n. 1, p. 58-65, 2015), sendo uma forma promissora de geração de biomassa com potencial para diversas aplicações. Os micro-organismos fotossintetizantes são de fácil cultivo, ocupam áreas pequenas, podem ser facilmente controlados, não estão sujeitos às variações ambientais e possuem curto tempo de geração quando comparados às células vegetais, visto que esses micro-organismos se reproduzem normalmente por fissão binária, permitindo assim que o ciclo celular ocorra em poucas horas (BENEMAN, *J. of Indus. Microbiology*, v. 31, n. 5, p. 247-256, 1990).

[008] Os micro-organismos fotossintetizantes podem ser cultivados em meios de cultura alternativos suplementados de subprodutos e/ou resíduos agroindustriais, possibilitando uma redução nos constituintes do meio de cultura, um aumento da produtividade celular e/ou dos bioativos de interesse, além de ser uma alternativa de tratamento para remoção de poluentes, como fósforo e nitrogênio, principais causadores de eutrofização (GODOS et al., *BioresourTechnol.*, v. 100, n. 19, p. 4332-4339, 2009; CHINNASAMY et al., *BioresourTechnol.*, v. 101, n. 9, p. 3097-3105, 2010), reduzindo os impactos ambientais.

[009] Os constituintes do meio de cultura podem alterar a composição da biomassa dos micro-organismos fotossintetizantes. Estes reagem às condições adversas de seus habitats com mecanismos adaptativos, como a síntese de uma ampla rede de metabólicos secundários bioativos (MARKOU & NERANTZIS, *Biotechnol. Adv.* v. 31, p.

1532–1542, 2013). As diferentes vias metabólicas são ativadas como estratégias de defesa por cada espécie de microalga, explicando assim sua diversidade em termos de composição estrutural e química (MORAIS et al., BioMed Res. Int. ID835761, 2015). Melo et al., (Chemosphere, v. 204, p. 344-350, 2018) avaliaram o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em diferentes tipos de subprodutos agroindustriais (vinhaça, milhocina e soro de leite) e observaram que o cultivo suplementado com milhocina apresentou maior rendimento de biomassa quando comparado ao cultivo autotrófico, e maior teor de proteínas na biomassa, enquanto que o uso do soro de leite proporcionou maior teor de carboidratos na biomassa. Xie et al., (Bioresour. Technol., v. 136, p. 775-779, 2013) relataram que a *C. vulgaris* sintetiza mais proteínas quando cultivada em ambientes ricos em nitrogênio e quando este encontra-se limitado em meio de cultura, as microalgas reduzem sua síntese proteica. Silva et al., (Ann Microbiol. Res., v. 1 n. 1, p. 9-19, 2017) relataram que a atividade fibrinolítica a partir do extrato da microalga *Chlorella vulgaris* varia com a concentração de milhocina adicionada ao meio de cultura. Sendo assim, o tipo de suplemento utilizado em um cultivo influencia no tipo e na quantidade de bioativos extraídos dos micro-organismos fotossintetizantes.

[010] Os documentos que antecedem o presente documento descrevem formulações com atividade cicatrizante utilizando extratos de vegetais, de macroalgas e/ou microalgas e aplicação de compostos isolados destes. Alguns métodos utilizando os extratos advindos desses podem ser encontrados nos documentos patentários e artigos a seguir.

[011] A patente BR 102014033126-3 A2 descreve uma formulação à base de hemicelulose e óleo essencial de uma espécie nativa do gênero *Lippia*, apresentando atividade cicatrizante e antimicrobiana. É um produto fitoterápico preparado a partir das folhas da espécie *Lippia*, as quais são submetidas à extração de óleos essenciais pela técnica de destilação com arraste de vapor d'água. Posteriormente, é utilizado um funil de vidro contendo sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para retirar a água residual. Para a preparação da formulação é utilizado o veículo galactonamana a 1.5%, óleo essencial da espécie, conservante brometo de cetiltrimetilamina 0.1% e água. Esse documento de patente difere por utilizar uma formulação à base de extrato aquoso da microalga

Chlorella vulgaris, utilizando como método de extração dos bioativos, solução tampão e sonicação. Além disso, utiliza como veículo o gel de policarboxietileno.

[012] A patente BR 102014008978-0 A2 descreve uma composição medicamentosa com ação antibiótica, anti-inflamatória e cicatrizante, mediante a associação sinérgica de extratos vegetais secos da *Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L. e *Plantago major* L., e opcionalmente da *Casearia sylvestris* SW, para aplicação tópica, sob a forma de biofilme bacteriano ou na forma farmacêutica sólida, sem a utilização de conservantes. A presente invenção utiliza uma formulação com apenas um gênero, *Chlorella*, onde os seus compostos demonstram sinergia e garantem cicatrização eficaz.

[013] A patente BR 102013000137-6 A2 1 descreve uma nova formulação farmacêutica à base do extrato vegetal seco de *Chenopodium ambrosioides* L., extraído a partir do processo de maceração utilizando como extratores os solventes etanol e metanol, sendo aceitável para uso oral, parenteral ou tópico com finalidade profilática e terapêutica em processos inflamatórios e de cicatrização tecidual para uso em humanos e animais. Esse documento de patente difere por utilizar uma formulação à base de extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando como método de extração dos bioativos a sonicação em solução tampão.

[014] Nascimento-Neto et al., (Marine Drugs., v. 10, p. 1936-1954, 2012) avaliaram o potencial cicatrizante de uma lectina purificada extraída por cromatografia de troca iônica da alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* e observaram propriedades pró-cicatrizantes em feridas agudas em camundongos, destacando-se como um possível tratamento de feridas agudas. Polissacarídeos sulfatados extraídos das algas *Padina tetrastromatica* e *Padina boergesenii*, extraídos com água quente e precipitados com CaCl₂, demonstraram-se eficazes na formação de colágeno e regeneração da pele quando aplicados utilizando pomadas como veículo em feridas de ratos (KORDJAZI et al., International J. of Mol. Cellular Medicine. v. 2, n. 4, p. 156-163, 2013). O extrato em pó da alga marinha *Eucheuma cottonii*, preparado a partir de agitação mecânica e filtrado, e posteriormente submetido à secagem em estufa para a obtenção do pó, apresentou uma rápida contração da ferida, epitelização e crescimento do pelo em ratos machos (FARD et al., J. of Animal and Veterinary Advances, v. 5, p.

6373–6380, 2011). Um curativo composto de quitosana, o qual foi adquirido comercialmente, contendo fucoidan, um polissacarídeo sulfatado, extraídos da macroalga *Fucus vesiculosus*, apresentou uma excelente regeneração dérmica, reepitelização e rápido fechamento da ferida em queimaduras superficiais de coelhos (SEZER et al., AAPS Pharm. Sci. Tech., v.8, p.94–101, 2007). Esse documento de patente difere por utilizar uma formulação à base de extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, a partir do cultivo mixotrófico, sem requerer o isolamento de bioativos para aplicação nas feridas, utilizando como método de extração dos bioativos a sonicação em solução tampão.

[015] A patente WO0075282 (A1) relata um método para obter um extrato, que é estável ao calor e tem uma atividade antioxidante e de cicatrização de feridas. Foi realizado a partir do meio de cultura de microalgas cultivadas e depois submetidas à supersaturação de oxigênio que induz um forçamento metabólico para superprodução de compostos antioxidantes. Após este período, as algas foram separadas por centrifugação, sendo depois filtradas através de membrana de celulose e assim obtendo o extrato com aplicações de interesse biotecnológico. Esse documento de patente difere por utilizar na metodologia ao utilizar o método de sonicação para obtenção dos bioativos presentes na biomassa da microalga, além de utilizar o extrato aquoso proveniente apenas da microalga *Chlorella vulgaris* a partir do cultivo mixotrófico.

[016] A patente WO2012052356 (A2) teve como objetivo desenvolver extratos baseados em fontes renováveis, microalgas, com intuito de modular e estimular o metabolismo da pele humana e dos folículos capilares, a fim de obter melhorias na perda e despigmentação do cabelo. Os extratos aquosos utilizados foram constituídos pelas microalgas: *Monodus sp.*, *Thalassiosira sp.*, *Chaetoceros sp.* e *Chlorococcum sp.* Foram utilizados solventes consistindo em acetato de etila, etanol absoluto e água em quantidade adequada para que os compostos ativos presentes na biomassa passem para a fase solvente, sendo opcionalmente a temperaturas elevadas. A extração foi realizada de modo sequencial, em três etapas: acetato de etila > etanol absoluto > água, para obter uma melhor separação dos compostos. Esse documento de patente difere por utilizar na metodologia ao utilizar o método de sonicação para obtenção dos

bioativos presentes na biomassa da microalga, além de utilizar o extrato aquoso proveniente apenas da microalga *Chlorella vulgaris* a partir do cultivo mixotrófico, onde os seus compostos apresentam sinergia e garantem cicatrização eficaz.

[017] A patente PI0801132-0 A2 relatou uma formulação de um creme antioxidante e cicatrizante com B-caroteno a partir de microalgas. O produto na forma de creme consistiu na mistura de componentes como β -caroteno da microalga *Dunaliella salina* com a própolis na forma de gel, junto com o ácido úsnico na forma de pó. Esse documento de patente difere na metodologia por utilizar uma formulação com apenas um gênero, sem o requerer o isolamento de bioativos, uma vez que os seus compostos apresentam sinergia e garantem cicatrização eficaz, bem como não necessita da adição de outros componentes.

[018] Pietramaggioriet al., (J. of Trauma and Acute Care Surgery, v. 64, n. 3, p. 803–808, 2008) relatou o uso de um polímero (poli-N-acetil-glicosamina), extraído por separação e purificação, de uma microalga produzida pela Marine Polymer Technologies, utilizado como curativo para feridas e queimaduras. Esse documento de patente difere por utilizar na metodologia uma formulação contendo extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, a partir do cultivo mixotrófico, sem requerer o isolamento de bioativos para aplicação nas feridas.

[019]O extrato aquoso de um microrganismo fotossintetizante, a cianobactéria *Spirulina platensis*, obtido por maceração em diferentes solventes (metanol, etanol e água ultrapura) e evaporadas a 40° C, estimulou a migração e diferenciação das células de fibroblastos *in vitro* em menor intervalo de tempo quando comparado ao grupo controle com alantoína, podendo ter aplicação biomédica no tratamento de várias feridas crônicas, especialmente em pacientes com diabetes mellitus (SYARINA et al., EXCLI Journal, v. 14, p. 385-393, 2015). Estudos de cultura celular *in vitro* demonstraram que o extrato bruto obtido por sonicação de *Spirulina platensis* a partir de cultivo autotrófico, na presença de tampão fosfato pH 7,4 apresentaram um efeito significativo na proliferação da linhagem celular L929 de fibroblastos, quando incorporados em creme para pele. Com base nesses resultados, sugerem que *S. platensis* pode ser incorporada em creme para pele ou biomateriais, podendo ser um forte promissor para

uso posterior em aplicações biomédicas, particularmente para feridas (GUNES et al., *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 1824–1832, 2017). Esse documento de patente difere por utilizar o formulado, utilizando gel como veículo, contendo extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em condição mixotrófica.

[020] Hidalgo-Lucas et al., (*Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, v.13, p.93-102, 2014) investigaram a cicatrização de feridas utilizando amostras de ROQUETTE *Chlorella* sp., pó comercial produzido pela ROQUETE Frères, através de aplicação cutânea e administração oral, demonstrando um potencial médico para doenças de pele. Esse documento de patente difere por utilizar um formulado de gel contendo extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*, a partir do cultivo mixotrófico, sem a necessidade de uma administração oral para potencializar o resultado. Ademais, o extrato celular permite melhor disponibilidade dos bioativos presentes na biomassa.

[021] A presença de agentes com atividade cicatrizante extraídas do extrato aquoso da biomassa da *C. vulgaris* possibilita a reparação tecidual de maneira rápida e eficiente quando comparado a outros produtos já vendidos no mercado. Nesse contexto, o presente invento apresenta um fácil cultivo e de forma não onerosa sendo derivado de uma fonte natural, reduzindo então a possibilidade de efeitos colaterais e toxicidade. Com isso, o desenvolvimento e aplicação do dito FORMULAÇÃO EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA proposto neste documento de patente de invenção possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico compreendido no estado da técnica possui a tecnologia de obtenção, desenvolvimento e aplicação semelhantes, podendo ser utilizado preferencialmente como um método potencial cicatrizante sobre feridas cutâneas tópicas em geral (lesões cirúrgicas, escoriações, fissuras, etc.). Destaca-se ainda que a tecnologia proposta neste documento de patente de invenção apresenta também os outros critérios de patenteabilidade, como atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

Descrição da Invenção

[022] O objetivo do presente invento foi à obtenção de um produto cicatrizante a base de extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* com reparação tecidual em menor tempo, de fácil aplicação, que não proporcione desconfortos e sem a produção de efeitos secundários nocivos.

[023] A biomassa microalgal utilizada para a preparação do extrato aquoso celular é obtida a partir de cultivos autotróficos, mixotróficos ou a mistura de ambos. O cultivo mixotrófico ocorre pela adição de um ou mais subproduto e/ou resíduo agroindustrial rico em proteínas. Após o cultivo, a biomassa é concentrada.

[024] A biomassa microalgal concentrada sofre lise da parede celular por método físico para a preparação do extrato aquoso celular.

[025] O extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* poderá ter como veículo outras formas farmacêuticas, como cremes e pomadas. Adicionalmente, conservantes poderão ser acrescentados ao veículo de hidrogel constituído pelo polímero carboxivinílico (Carbopol 940), como exemplo metilparabeno, quatérnio-15 ou fenoxietanol, caso não haja a presença de álcool na formulação do gel. Além disso, 3-5% de glicerina pode ser adicionada, com a finalidade de evitar o ressecamento do gel.

[026] O objeto da invenção será descrito em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

[027] A presente invenção é descrita a seguir e melhor compreendida através da Figura 1.

[028] Figura 1 representa a produção da biomassa, preparação do extrato celular e da formulação em hidrogel.

Descrição detalhada da Invenção

[029] A preparação do formulado em hidrogel com atividade cicatrizante procedeu-se inicialmente com a produção da biomassa microalga, extração dos bioativos e, por último, a formulação.

[030] Para a produção da biomassa, as microalgas podem ser cultivadas em meio de cultura líquido contendo água e sais minerais de modo autotrófico ou mixotrófico com suplementação de uma fonte de orgânica rica em proteínas, preferencialmente milhocina, na concentração entre 0,5 – 2,0 %, preferencialmente 1,0 %. Os meios de cultura devem ser previamente esterilizados por método físico.

[031] Os recipientes dos cultivos devem ser transparentes ou translúcidos. Os cultivos aerados e iluminados naturalmente e/ou artificialmente com intensidade luminosa de 20 – 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, preferencialmente a 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ até as células atingirem a fase exponencial de crescimento celular.

[032] As células devem ser concentradas através da separação das células do meio de cultura para a extração dos bioativos com atividade cicatrizante. Os métodos de separação podem ser por sedimentação, centrifugação, filtração, floculação. Posteriormente, as células concentradas em meio aquoso e a parede celular rompida por métodos mecânico, químico, físico ou associação de ambos, tais como congelamento/descongelamento, pérolas de vidro, choque osmótico, homogeneização, preferencialmente por sonicação, para a extração dos bioativos presentes na biomassa.

[033] Após a extração, a fração sólida foi separada da líquida para obtenção extrato aquoso celular, por método físico, preferencialmente centrifugação. A fração líquida do extrato celular foi adicionada ao veículo de hidrogel na proporção de 5 – 80%, preferencialmente 25%, e o pH ajustado para valores de 6,0 – 8,0, preferencialmente 7,0. O veículo de hidrogel é constituído preferencialmente por carboxivinílico (Carbopol 940) e etanol dissolvidos em água, preferencialmente na concentração de 2% de carboxivinílico e 15% de Etanol.

[034] A presente invenção é melhor descrita de acordo com os exemplos a seguir:

Exemplo 1. Determinação do cultivo.

[035] A microalga *Chlorella vulgaris* (UTEX 1803) foi adquirida da Coleção de Cultura de Algas da Universidade do Texas (Austin, TX). Este micro-organismo foi cultivado em meio líquido constituído por água e sais minerais (BISCHOFF & BOLD, University of Texas Publications, n. 6318, p. 1-95, 1963) de maneira autotrófica ou

mixotrófica com suplementação de 1% de milhocina (SILVA et al., Ann Microbiol. Res.,v.1, n.1, p. 9-19,2017). A milhocina foi previamente tratada pela adição de base até atingir pH 8.0 e esterilizada por autoclavação a 121 °C por 20 minutos (LIGGETT& KOFFLER, Bacteriol Rev., v. 12, n. 4, p. 297–311,1948). Os cultivos em frascos de Erlenmeyer foram aerados continuamente, à temperatura de 27±3°C e intensidade luminosa de 52±5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As células foram obtidas no final da fase exponencial de crescimento celular para a preparação dos extratos.

Exemplo 2. Determinação dos extratos.

[036] A biomassa foi concentrada e ressuspendida em tampão TRIS-HCl-NaCl 0,15 M, pH 7,5, na concentração de 5% p/v (50 mg/ml). A extração foi realizada por rompimento mecânico da membrana celular, preferencialmente utilizando sonicação, e os sobrenadantes foram utilizados como extrato bruto para as atividades biológicas.

Exemplo 3. Determinação das formulações.

[037] As formulações foram compostas por extratos aquosos autotróficos ou mixotróficos da microalga nas concentrações (10% e 25%), utilizando hidrogel como veículo. O gel hidro-alcoólico foi constituído por 2% de carboxivinílico, 15% de Etanol P.A. em água purificada (CLAVIJO & COMES, ISBN: 84-922568-0-X, 1997) e pH ajustado para 6,5-7,0 com Trietanolamina. Posteriormente, o gel foi submetido à esterilização, preferencialmente em autoclave a 121° C por 20 minutos. Os produtos foram armazenados em geladeira e protegidos da luz até sua utilização.

Exemplo 4. Determinação de proteínas.

[038] O conteúdo proteico dos extratos celulares autotrófico e mixotrófico foram determinados utilizando Kit BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC), seguindo a metodologia do fabricante. Os resultados demonstraram que o extrato autotrófico e mixotrófico apresentaram 1,011 mg/mL e 1,174 mg/mL de proteínas solúveis totais, respectivamente.

Exemplo 5. Atividade hemaglutinante.

[039] O ensaio de aglutinação de células sanguíneas foi realizado em placas de microtitulação contendo eritrócitos humanos do sistema ABO e de coelho previamente tratados com glutaraldeído a 2,5% (v/v) (CORREIA & COELHO et al., Appl. Biochem. Biotech., v.55, p. 261-273, 1995). A hemaglutinação foi observada macroscopicamente e considerada positiva no caso em que mais de 50% dos eritrócitos no poço foram aglutinados. Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH). Os resultados demonstraram que os extratos autotrófico e mixotrófico apresentaram títulos de hemaglutinação semelhantes com valores $>2^{48}$ para sangue de coelho. Em relação ao sistema sanguíneo humano ABO, apenas o extrato mixotrófico demonstrou atividade para o sangue tipo B, com valor de $>2^{24}$.

Exemplo 6. Atividade antioxidante.

[040] A atividade antioxidante dos extratos autotrófico e mixotrófico foi realizada pelo método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O extrato autotrófico apresentou atividade antioxidante 33,63% e o extrato mixotrófico de 54,64%.

Exemplo 7. Atividade antibacteriana.

[041] O ensaio antibacteriano dos extratos foi realizado utilizando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do teste de microdiluição em caldo descrito pelo CLSI (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017). As bactérias utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* UFPEDA700, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 1019B, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA64, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC6057, todas cultivadas em caldo Mueller-Hinton. Os extratos foram previamente liofilizados e em seguida ressuspendidos em água destilada esterilizada a uma concentração de 0,1% (100 mg/ml). As bactérias foram inoculadas a 1×10^7 UFC/mL. A CIM foi verificada através de diluição seriada, e as concentrações dos extratos testados foram de 0,100 a 0,195 mg/mL. A CIM foi determinada como a menor concentração de cada extrato capaz de inibir o crescimento microbiano. O crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 600nm, após

24h de incubação a 37°C. A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano foi calculada e os resultados demonstraram que o extrato bruto autotrófico foi capaz de inibir o crescimento de todos os isolados testados em sua concentração mais alta (100mg/mL). Em relação ao extrato mixotrófico, este foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* na CIM de 0,781 mg/mL, *E. faecalis* em 50mg/mL e *E. colina* concentração de 100mg/mL.

Exemplo 8. Atividade cicatrizante.

[042] Um total de 63 camundongos fêmeas (*Mus musculus*) Swiss (40-60 dias de idade); foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Durante o procedimento experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente controlado, e fotoperíodo 12h claro/escuro. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and News of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pelo CEUA-UFPE. Nº do processo: 23076.017009/2012-13. Os animais foram aleatoriamente organizados em dois ensaios experimentais. No primeiro ensaio, foram divididos em três grupos ($n = 9$), de acordo com o tratamento: Grupo I: 10% de extrato autotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EA10%); Grupo II: 10% de extrato mixotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EM10%); Grupo III: Controle negativo contendo apenas gel de polímero carboxivinílico (CC). No segundo ensaio, os animais foram divididos em quatro grupos ($n=9$) de acordo com sua formulação: 25% de Extrato Autotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EA25%); 25% de Extrato Mixotrófico + gel de polímero carboxivinílico (EM25%); Controle negativo contendo gel de polímero carboxivinílico (CC); Controle positivo (CP). Os camundongos foram anestesiados por via intramuscular com Xilazina (10 mg.kg^{-1}) e Quetamina (115 mg.kg^{-1}) (HALL & CLARKE, Veterinary anaesthesia. 9.ed., London: Baillière Tindall, p. 51-79, 1991), seguidos por tricotomia manual e antisepsia com álcool iodado a 0,1% na região interescapular do animal. A região foi demarcada com um molde circular esterilizado (1 cm^2). Após a cirurgia, cada ferida de cada grupo foi tratada com aplicação tópica diária em dose única

contendo ± 100 mg da respectiva substância de sua formulação, durante 12 dias de experimento. As análises macroscópicas foram realizadas através da mensuração diárias das feridas utilizando um paquímetro digital, para determinar a área da ferida e o grau de contração da oclusão, através das respectivas equações: $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde "A"= área (mm^2), "R"= raio maior e "r" = raio menor (PRATA et al., Acta Cir. Bras., v.3, n.2, p.43–48, 1988); e $\%W = [(W_0 - W_i) / W_0] / W_0 \times 100$, onde %W= porcentagem do grau de contração, W_0 = área inicial e W_i = área do dia (ZHANG et al., Lipids Health Dis., v. 9, n. 24, 2010). As eutanásias foram realizadas pela administração de injeção intraperitoneal de tiopental sódico nos 3º, 7º e 12º dias de pós-operatório, e as biópsias das feridas foram coletadas para avaliar a evolução da cicatrização nos grupos, através de análises patológicas e histomorfométricas. Os materiais coletados foram fixados em formalina tamponada, submetidos à bateria de preparação histológica e posteriormente embebidos em parafina. Amostras de cortes de 4 μm foram coradas com: Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson (TM) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lamínas foram submetidas à análise descritiva comparativa dos grupos experimentais em microscópio óptico binocular (modelo Leica, DM 500) com aumento de 100 e 400x, onde foram avaliadas as características celulares e teciduais da pele após lesão e posterior cicatrização. Para o estudo histomorfométrico foram determinados cinco campos dos parâmetros em análise para cada animal/grupo (aumento total de 400x) para obter a média. As imagens foram submetidas à contagem de células inflamatórias, fibroblastos, número de vasos sanguíneos, densidade de colágeno, tecido adiposo e anexos cutâneos.

Exemplo 9. Análises macroscópicas dos animais.

[043] No primeiro ensaio, pode-se observar que a cicatrização evoluiu com o passar do tempo. No 1º dia, todos os animais estavam com as bordas das feridas edemaciadas, apresentando exsudato inflamatório e eritema, permanecendo assim até às 48h de pós-operatório. Os grupos demonstraram formação de crosta a partir do 7º dia de experimento, e a formação de cicatriz foi evidenciada em todos os grupos a partir do 12º dia de experimento. O segundo apresentou semelhança macroscópica com o ensaio anterior em relação aos 3 primeiros dias de pós-operatório, no entanto foi observado que no 7º dia do grupo EM25% o grau de contração da ferida foi

significativamente maior quando comparado aos demais grupos. Ao final do experimento, todos os grupos evoluíram para a cicatrização após os 12 dias. Foi possível observar também que o grupo EM25% apresentou uma cicatriz mais fina e com maior oclusão de fechamento.

Exemplo 10. Média dos valores de grau de contração.

[044] No primeiro ensaio, no 3º dia, os valores do grau de contração foram EA10%= 19,36%; EM10%=39,25%, CC=26,49%. A partir do 7º dia, os grupos apresentaram grau de contração: EA10%= 57,07%, EM10%=76,84%, CC= 44,95%. É importante salientar que no 7º dia o grupo EM10% demonstrou uma retração macroscópica significativa quando comparado aos demais. No entanto, no 12º dia de experimento todos os grupos demonstraram valores similares de contração de ferida: EA10%=84,40%, EM10%=91,65% e CC=88,05%. Para avaliar se uma maior concentração de extratos poderia promover uma cicatrização mais rápida, foi necessário investigar a adição de 25% de ambos os extratos ao veículo gel de polímero carboxivinílico. No segundo ensaio, no 3º dia de tratamento as médias dos valores de grau de contração foram EA25%= 16,58%; EM25%=9,19%, CC=15,41% e CP=0%. No 7º dia, os grupos apresentaram grau de contração de EA25%= 60,01%, EM25%=86,92%, CC = 55,17%, CP = 63,40%. A retração macroscópica evidenciada pelo grupo EM25% no dia 7º dia foi estatisticamente significativa quando compara aos demais ($p<0,05$). Ao final do experimento os grupos apresentaram graus de contração de EA25%= 84,76%, EM25%= 90,06%, CC=85,23%, CP=82,42%.

Exemplo 11. Análises Histopatológicas.

[045] O segundo ensaio realizado, utilizando 25% de cada extrato adicionado ao veículo de hidrogel, demonstrou clara evidência de melhor e mais rápida cicatrização tecidual quando comparado ao ensaio anterior, sendo assim submetidas às amostras coletadas para análises patológicas e morfométricas. A coloração de H&E apresentou o processo evolutivo da cicatrização das feridas, com clara evidencia de epitelização, queratinização e formação de área cicatricial nos grupos tratados com os extratos da microalga, principalmente no grupo EM25%, com presença de folículo piloso no 12º dia

de tratamento. A melhor cicatrização neste grupo também foi evidenciada na coloração de TM, onde foi observado, no mesmo período de pós-operatório, uma redução na quantidade de fibroblastos e um maior depósito de colágeno, além da presença de glândulas sebáceas e folículos pilosos como já anteriormente mencionado. A coloração de PAS demonstrou que o grupo EM25% no 12º dia de experimento possuía uma lâmina basal bem definida, o que não foi observado nos demais grupos.

Exemplo 12. Análise Histomorfometria.

[046] As análises histomorfométricas (células inflamatórias, fibroblastos, número de vasos sanguíneos, densidade de colágeno, tecido adiposo e anexos cutâneas) foram realizadas com as amostras do segundo ensaio, coletadas no 12º dia de experimento. Essas demonstraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de células fibroblásticas no grupo EM25% (2,91%), quando comparado aos grupos controles CC (30,56%) e CP (40,54%). A densidade de colágeno também foi avaliada e observou-se um grande aumento nos dois grupos tratados com extrato de microalgas (EA25%: 49,75 e EM25%: 57,13%) quando comparado com CC e CP (34,51%, 32,52%, respectivamente). O grupo tratado com 25% do extrato mixotrófico também apresentou uma redução significativa nas células inflamatórias (3,10%) quando comparado aos controles, mostrando uma atividade anti-inflamatória. No mesmo grupo, observou-se alta presença de anexos cutâneos (30,27%), como folículos pilosos e glândulas sebáceas, o que não foi evidenciado nos demais grupos (EA25%: 4,8; CC: 3,8%; CP: 2,7%), demonstrando capacidade de reepitelização tecidual. Um resumo dos resultados obtidos estão descritos na Tabela 1.

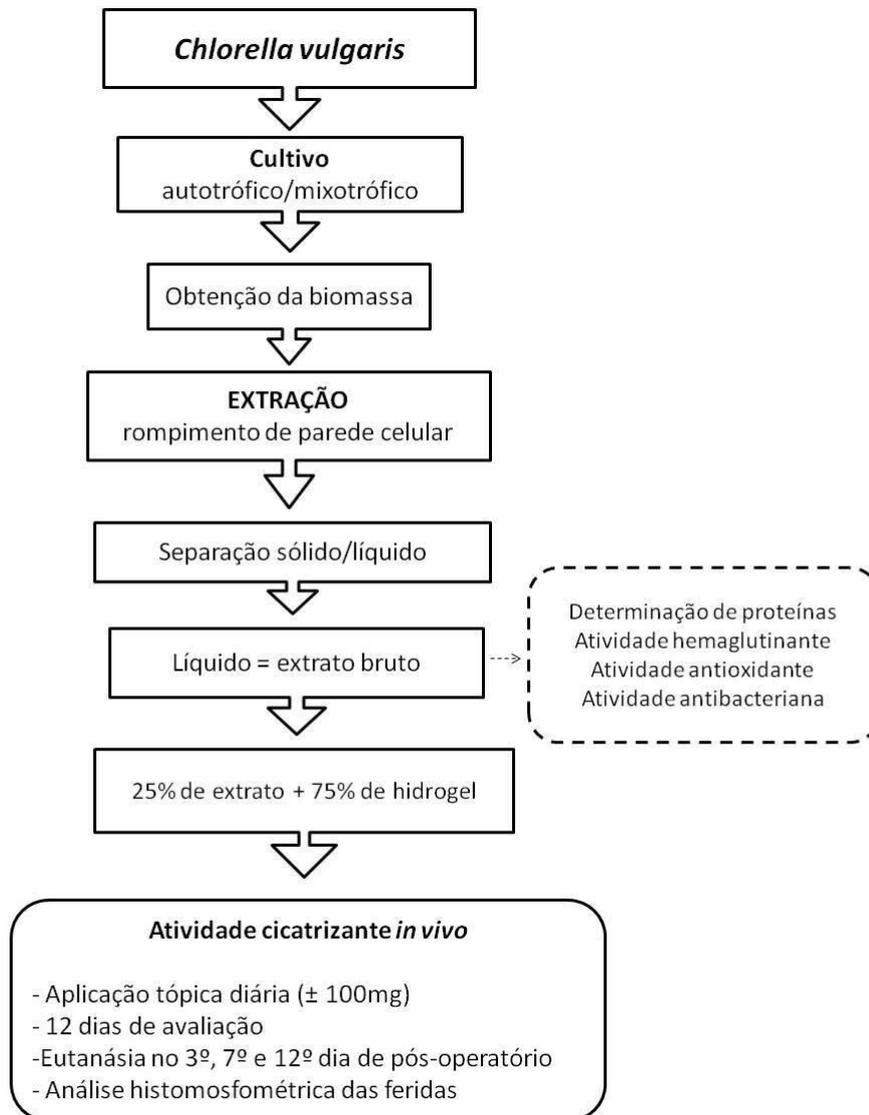
[047] Tabela 1. Evolução da atividade cicatrizante dos grupos controle negativo (CC), controle positivo (CP), Extrato autotrófico (EA25%) e Extrato mixotrófico (EM25%).

Dia	CC	CP	EA25%	EM25%
1	- Edema - Eritema - Exsudato			

3	<ul style="list-style-type: none"> - Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta 	<ul style="list-style-type: none"> - Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta 	<ul style="list-style-type: none"> - Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta 	<ul style="list-style-type: none"> - Edema - Eritema - Infiltrado inflamatório - Início da formação de crosta
7	<ul style="list-style-type: none"> - Intensa angiogênese - Infiltrado inflamatório 	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de hemorragia local - Angiogênese Moderada 	<ul style="list-style-type: none"> - Discreta angiogênese - Fibroblastos - Deposição de colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> - Discreta angiogênese - Fibroblastos - Deposição de colágeno - Queratinização
12	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de cicatriz; - Moderada deposição de colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de cicatriz; - Discreta angiogênese - Moderada deposição de colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de cicatriz; - Queratinização - Redução da epiderme - Aumento da derme - Intensa deposição de colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de discreta cicatriz; - Presença de anexos cutâneos - Queratinização - Redução da epiderme - Aumento da derme - Intensa deposição de colágeno - Lâmina basal

REIVINDICAÇÕES

1. “FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA”, **caracterizado por** compreender as etapas de produção da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris*, seguida da preparação do extrato celular aquoso e formulação de gel com atividade cicatrizante à base do dito extrato aquoso da microalga.
2. “FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** biomassa pode ser obtida de cultivos autotróficos, mixotróficos ou mistura de ambos.
3. “FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA”, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** biomassa ser concentrada para a preparação do extrato celular na qual consiste no rompimento celular da biomassa microalgal em meio aquoso por método físico ou mecânico, tais como congelamento/descongelamento, pérolas de vidro, choque osmótico, homogenização, preferencialmente sonicação.
4. “FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA”, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo** meio aquoso consiste de água ou solução tampão com pH entre 6,0 - 8,0, preferencialmente 7,0.
5. “FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA”, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** proporção entre o extrato celular aquoso e o veículo gel de polímero carboxivinílico pode variar entre 5 e 80%, preferencialmente 25%.
6. “FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA”, **caracterizada por** um produto à base de um gel com extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* com atividade cicatrizante.

**Figura 1**

RESUMO

“FORMULAÇÃO TÓPICA EM GEL COM ATIVIDADE CICATRIZANTE CONTENDO EXTRATO DE MICROALGA”.

A presente patente de invenção refere-se à forma farmacêutica gel à base do extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris* para o tratamento cicatrizante de feridas cutâneas em geral, particularmente feridas incisas. A microalga foi cultivada em meio de cultivo autotrófico ou, preferencialmente, mixotrófico com a adição de um ou mais subproduto e/ou resíduo agroindustrial rico em proteínas. A biomassa microalgal obtido do cultivo foi concentrada e a parede celular rompida em solução aquosa, obtendo uma fração sólida e uma líquida. A fração líquida, denominada de extrato bruto, foi utilizada para a preparação do formulado em gel. O efeito cicatrizante do gel foi comprovado a partir do sétimo dia de tratamento em camundongos saudáveis. O produto é de fácil obtenção e aplicação e consegue produzir resultados eficazes na regeneração celular, em tempo inferior ao observado no tratamento convencional à base de outros medicamentos disponíveis no mercado. Ademais, os bioativos presentes no produto não precisam ser purificados para realizarem sua ação cicatrizante. Este produto tem aplicação na área da Biotecnologia e farmacêutica que visa, principalmente, resultados mais rápidos e eficientes na cicatrização e reconstituição tissular.