



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

(21) BR 132020017700-0 E2



(22) Data do Depósito: 31/08/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 15/03/2022

(54) Título: FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA

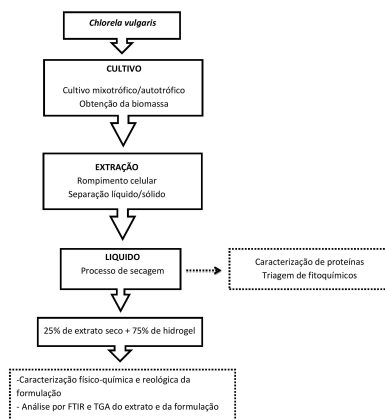
(51) Int. Cl.: A61K 36/05; A61P 17/02.

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

(72) Inventor(es): ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO; RAQUEL PEDROSA BEZERRA; 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; MICALEYDE SOARES DO EGITO; WILLIANA TORRES VILELA; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; PEDRO JOSE ROLIM NETO; ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDAO COSTA; DANIELA DE ARAUJO VIANA MARQUES.

(61) Pedido original do CA: BR102018077212-0 - 27/12/2018

(57) Resumo: FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA. A presente patente de invenção refere-se a uma formulação em gel à base do extrato da microalga *Chlorella vulgaris* para o tratamento cicatrizante de lesões cutâneas em geral, particularmente lesões acidentais ou cirúrgicas. A biomassa microalgal é submetida ao rompimento celular por método físico e a fração líquida denominada de extrato celular, preferencialmente concentrada, utilizada para preparação da formulação de hidrogel de carbopol. O pH é fisiologicamente compatível com a alcalinidade de feridas abertas e crônicas, sendo também um pH ótimo para importantes fatores de cicatrização, preferencialmente na faixa de 7,0 - 7,5. As análises de viscosidade e espalhabilidade da formulação demonstraram um comportamento ideal para formulações semissólidas, possuindo alta capacidade de fluidez com alta permanência desta no local da aplicação. O extrato celular, carbopol e a formulação foram submetidos à espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e apresentaram compatibilidade química e física entre o veículo e ativo. O produto apresentou características desejáveis para a forma farmacêutica gel. Este produto tem aplicação na área da Biotecnologia que visa, principalmente, resultados mais rápidos e eficientes na cicatrização e reconstituição tissular.



FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA

Campo da invenção

[001] O presente relatório de invenção é um pedido adicional a patente BR 10 2018 077212 0 depositada em 27/12/2018.

[002] O presente relatório de invenção trata de uma formulação em gel à base de extrato obtido através da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* que é capaz de manter a viscosidade e a integridade do gel quando exposto a lesões acidentais ou cirúrgicas, por exemplo. Com isso, mostra-se vantajosa em relação à economia de produto e na adesão ao tratamento pelo paciente, uma vez que garante uma menor fricção em um epitélio já fragilizado e uma excelente compatibilidade com pH de feridas cutâneas crônicas, que variam entre 7,5 - 8,9. É um método rápido e simples, que apresenta maior vantagem econômica quando comparado a outros produtos utilizados, estando no campo da biotecnologia e farmácia.

Fundamentos da invenção

[003] A patente referenciada no primeiro paragrafo utilizava formulado de hidrogel de carbopol contendo 2% de carboxivinílico em água purificada, 15% de Etanol P.A., 25% de extrato aquoso e pH ajustado para 6,5-7,0 com Trietanolamina (q.s.p). O tratamento cicatrizante conseguiu produzir resultados eficazes na regeneração celular, em tempo inferior ao observado no tratamento convencional à base de outros medicamentos disponíveis no mercado. Com intuito de aprimorar as propriedades organolépticas e reológicas foi incorporado o extrato seco à base de carbopol. A avaliação reológica demonstrou fluxo pseudoplástico Não-Newtoniano, característico de agentes semissólidos, com característica tixotrópica utilizando 0,8% de carboxivinílico. Esse fluxo apresentado significa que a formulação pode fluir facilmente e se espalhar sobre a área injuriada, resultado clinicamente relevante. A formulação foi ajustada para pH de 7,0-7,5 compatível com o pH de lesões abertas (7,1 a 7,3) (DANDASI et al., Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, v.11, p.730-746, 2020). A partir dos estudos de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e análise termogravimétrica (TGA) foi possível verificar que o extrato seco da microalga *Chlorella*

vulgaris foi incorporado com sucesso ao hidrogel de carbopol, sugerindo ausência de interação química.

[004] As microalgas são um grupo de grande diversidade filogenética, eucarióticos fotossintéticos, unicelulares, presentes em habitats de água doce e marinhos, que possuem mecanismos adaptativos às variações de seus habitats (temperatura, salinidade e intensidade luminosa), sendo capazes de sintetizar, metabolizar, acumular e secretar uma diversidade de metabólitos biologicamente ativos, entre eles estão proteínas, lipídeos e carboidratos, em proporções que variam a depender das condições fornecidas durante o seu crescimento (WILD et al., *Algae Research*. v.38, 2019), as quais podem ser determinantes para diversas atividades biológicas conhecidas, tais como: antitumorais, antimetastáticas, antiviral, antibacteriana, antiulcerogênica e estimulante do sistema imunológico, sobretudo através do aumento da expressão de citocinas, incluindo as existentes no processo de cicatrização e reparação celular, contribuindo para uma atividade cicatrizante (EL-CHAGHABY et al., *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, v. 23, n.4, p.521-526, 2019).

[005] As microalgas são microrganismos com potencial atrativo para indústria farmacêutica, cosmética, nutricional e produção de biocombustíveis, podem converter a CO₂ e energia solar em energia química com eficiência fotossintética dez vezes maior quando comparadas às plantas terrestres (WANG et al., *Bioresource Technology*, v. 184, p. 355-362, 2015). A sua alta taxa de crescimento, menor ocupação de terra e água, além da capacidade de crescer sob condições adversas, como em altas condições salinas ou em áreas que não têm nutrientes requeridos por outras culturas e sua baixa toxicidade, evidencia que as microalgas têm muitas vantagens sobre espécies oleaginosas (CHISTI, *Biotechnology Advances*, v. 25, n.3, p. 294-306, 2007; CHISTI, *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008).

[006] O gênero *Chlorella* possui destaque na literatura demonstrando sua excelente capacidade na produção de bioenergéticos e produtos naturais (ABDULLA et al., *Green Engineering for Campus Sustainability*, p. 81-103, 2019; DERAKHSHANDEH et al., *Energy & Environment*, v. 30, p. 1341–1355, 2019). *Chlorella vulgaris* é uma microalga

verde, do filo Chlorophyta, que possui formato esférico, globular ou elipsoidal, sem presença de flagelos e possui um interesse comercial já consolidado, sendo até mesmo considerado um alimento nutricionalmente completo devido a sua alta produção e

armazenamento de bioativos (PHUKAN, N.M. et al. Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, 2011; FERREIRA et al., Algal Research, v. 45, 2020).

[007] A utilização de biomoléculas ativas presentes em microrganismos fotossintetizantes pode ser uma potencial fonte na produção de agentes cicatrizantes, uma vez que um só tipo de tratamento não preenche os requisitos para ser aplicado a todo o tipo de ferida, o qual deve ser adequado à natureza, à localização e ao tamanho da ferida. Dessa forma, um crescente interesse em estudar e entender como esses produtos naturais podem contribuir para o processo da cicatrização, com o objetivo contribuir ou complementar as formulações já existentes (BUDOVSKY et al., Wound Repair and Regeneration, v.23, n. 2, p. 171–83, 2015).

[008] 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, em que muitas vezes não seguem os padrões de qualidade (TUROLLA E NASCIMENTO. Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 289-206, 2006), podendo ter uma eficácia baixa, com efeitos colaterais diversos 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. 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).

[009] A cicatrização é uma cascata de eventos que visa promover reparo e reconstrução tecidual, pode ser dividida em três principais fases: 1. Inflamação:

dependente de mediadores químicos, fagocitam corpos estranhos e realizam a aderência da fibrina às células lesionadas; 2. Proliferação: fazem a reepitelização, formação de matriz e angiogênese promovendo o fechamento da lesão; 3. Remodelação: realizam a reformulação do colágeno aumentando a força de tensão e diminuindo a cicatriz (MANDELBAUM et al. An bras Dermatol, 2003). Assim, alterações em qualquer fase desses eventos como a má oxigenação local por distúrbios vasculares de maneira que afete o desenvolvimento de novos vasos, podem acarretar em outros fatores como perdas funcionais e até amputação, trazendo cada vez mais custos e desafios para a saúde pública (MATOS et al., Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde, v. 8, n. 1, p. 174-182, 2019).

[0010] As lesões agudas e crônicas acometem mais de oito milhões de pessoas no Brasil, tornando-se um problema de saúde pública, principalmente quando se considera outras doenças que podem acarretar no atraso da cicatrização, levando, em alguns casos, a um cenário ainda pior ao se pensar no número crescente de idosos no país e consequente aumento do número de casos de pacientes idosos acamados, formando gradativamente uma população com maior risco em desenvolver úlceras por pressão e outras lesões que demandam um maior gasto público, além de interferirem na qualidade de vida da população (SANTOS et al., Revista Rene, v. 15, n. 4, p. 613-620, 2014).

[0011] Diante disso, não só os conhecimentos da composição química dos extratos como a caracterização das formulações feitas a partir destes, como exemplo o pH, são cruciais a fim de direcionar as melhores aplicações e garantir a atividade ótima de fatores essenciais para a cicatrização e a tolerabilidade da pele ao produto. Isso por que feridas crônicas possuem pH mais alcalino e portanto gira em torno de 7,5 - 8,9. Associado a isso, alguns fatores importantes durante as fases de cicatrização como metaloproteinasas, plasmina e elastase possuem atividade ótima em pH também alcalino, em aproximadamente 8,0 (SANTOS et al., Journal of Aging and Innovation, v. 1, n. 4, 2012).

[0012] Concomitantemente, a viscosidade, que está relacionada ao fluxo do produto na pele e consequente tempo de contato e ação deste, a espalhabilidade, que assegura a facilidade e homogeneidade da aplicação quanto ao conteúdo e o alcance da área

pretendida, e a estabilidade, que confirmará a conservação dos componentes após um determinado período de tempo, sendo crucial para atestar o período de validade do produto, são de grande importância para a realização e comercialização de um novo

produto, uma vez que o conjunto desses fatores garantem a segurança e eficácia, além da aceitabilidade do usuário, atendendo a necessidade do mercado por produtos farmacologicamente ativos com atividade eficaz e financeiramente viáveis, possibilitando ainda o acesso ao tratamento adequado à população menos favorecida (LIS et al., Revista Saúde e Desenvolvimento, v. 13, n. 16, 2019; SILVA et al., Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 30, 2019).

[0013] Os documentos que antecedem o presente documento descrevem a caracterização de formulações com atividade cicatrizante utilizando extratos de vegetais e/ou e aplicação de compostos isolados destes. Alguns métodos utilizando os extratos advindos desses podem ser encontrados nos documentos patentários e artigos a seguir.

[0014] Andonova et al. (Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v.16, n.7, p.1455-1463, 2017) relataram a preparação e a caracterização de uma formulação bifásica para aplicação tópica, com fase hidrofílica e lipofílica, utilizando carbopol 940 a 1%, 5,0% de propilenoglicol, 10,0% de etanol 95% e 84,0% de água purificada, para fase lipofílica 85% de óleo de amêndoa e 15% de emulsificante. Com base nos resultados da caracterização, demonstraram estrutura homogênea, viscosidade com fluxo pseudoplástico e espalhabilidade apropriada para semissólidos e ausência de interação entre o óleo e o hidrogel de carbopol. O pH foi mantido na faixa de 6,3, que está dentro da faixa fisiológica com possível falta de irritação na pele. Esse documento de patente difere por utilizar um formulado de gel contendo extrato da microalga *Chlorella vulgaris* sem a necessidade de uma formulação bifásica.

[0015] Daudt et al. (Pharmaceutical Development and Technology, v.23, n.6, p. 620-627, 2017) investigaram os parâmetros reológicos e físicos para otimização no desenvolvimento de formulações tópicas a partir do extrato e amido de pinhão. A formulação em gel continha 0,6% de Carbopol 940 como polímero base, 3% de amido de pinhão, 5% de extrato de pinhão e 0,2% de sorbato de potássio. A formulação apresentou parâmetros de reologia com comportamento pseudoplástico, demonstrando

propagação adequada e sensação sensorial agradável, contribuindo para o desenvolvimento de formulações tópicas econômicas. Esse documento de patente

difere por utilizar um formulado de gel à base do extrato da microalga *Chlorella vulgaris*.

[0016] Dantas et al. (The Scientific World Journal, v. 2016, 2016) avaliaram as características físico-químicas e reológicas de uma formulação tópica de gel de monoterpene borneol (5%), no qual usou carbopol 940 (1%) como base, propilenoglicol (7%), metilparabeno (0,1%) e trietanolamina para obter pH 5,0 a 5,5. A formulação apresentou bons resultados nos estudos, mantendo sua estabilidade após oito meses de seu desenvolvimento no que se refere a características organolépticas, não mostrando diferença estatística nos resultados obtidos antes e após esse período, como o pH, além de mostrar uma espalhabilidade considerada esperada para formulações em gel. Esse documento de patente difere por utilizar um formulado de gel contendo extrato da microalga *Chlorella vulgaris*.

[0017] A patente KR101678402B1 apresentou uma nova formulação hidrogel com potencial cicatrizante feito a partir de tiramina introduzida em um grupamento carboxila do ácido algínico (50%), peroxidase do rábano silvestre (0,5%) e água purificada (30%). Foram analisadas as características reológicas dessa formulação, as quais obtiveram resultados positivos para uso, uma vez que as características obtidas foram as esperadas para produtos da forma de hidrogel. Estudos pré-clínicos utilizando ratos demonstraram regeneração epitelial precoce em 14 dias. Esse documento de patente difere por utilizar um formulado utilizando como base hidrogel de carbopol contendo extrato da microalga *Chlorella vulgaris*, produto natural, de fácil obtenção e alto rendimento.

[0018] A presença de agentes como terpenos, carboidratos e proteínas presentes no extrato da biomassa da *C. vulgaris* possibilita a reparação tecidual de maneira rápida e eficiente quando comparado a outros produtos já vendidos no mercado, com características reológicas adequada para semissólidos. Nesse contexto, o presente invento apresenta uma formulação tópica derivada de uma fonte natural, reduzindo então a possibilidade de efeitos colaterais e toxicidade. Com isso, o desenvolvimento e aplicação do dito FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE

MICROALGA proposto neste documento de patente de invenção é um pedido adicional a patente BR 10 2018 077212 0 depositada em 27/12/2018.

Breve descrição dos desenhos

[0019] A presente invenção é descrita a seguir e melhor compreendida através da figura 1.

A Figura 1 apresenta preparação do extrato celular e da formulação em hidrogel.

Descrição da invenção

[0020] O objetivo do presente invento é propor um gel cicatrizante à base de extrato seco proveniente da obtenção da biomassa de *Chlorella vulgaris*. Com compatibilidade com o pH fisiológico e fácil aplicação de tal modo que seu uso não proporcione desconfortos, apresentando segurança aos usuários e ausência de efeitos secundários nocivos.

[0021] A preparação do formulado em hidrogel com atividade cicatrizante procedeu-se inicialmente com a extração dos bioativos, secagem e formulação do produto.

[0022] A parede celular da biomassa microalgal é lisada em ambiente aquoso para extração dos bioativos utilizando métodos mecânicos, químicos, físicos ou associação de ambos, tais como congelamento/descongelamento, pérolas de vidro, choque osmótico, homogeneização, preferencialmente por sonicação. Os bioativos solúveis podem ser utilizados na forma aquosa ou concentrados em estufa, câmara seca, secagem por atomização, preferencialmente liofilização.

[0023] O extrato celular foi adicionado ao veículo na proporção de 5 – 80%, preferencialmente 25%. O veículo pode ser pomada, cremes, emulsões, preferencialmente hidrogel de carbopol. O veículo de hidrogel é constituído pelo polímero carboxivinílico (Carbopol 940) 0,5 – 2,0% (p/v) dissolvido em água, preferencialmente na concentração de 0,8% (p/v). Conservantes podem ser usados como exemplo metilparabeno, quarteto-15 ou fenoxietanol, preferencialmente metilsotiazolinona a 0,2% (p/v). O pH pode ser ajustado para valores de 4,9 – 9,0 com trietanolamina (q.s.p), preferencialmente 7,0 – 7,5.

Exemplos de concretizações da invenção

[0024] A presente invenção é melhor descrita de acordo com os exemplos a seguir:

Exemplo 1. Determinação do extrato celular

[0025] Após a lise da parede celular da biomassa microalgal, preferencialmente por sonicação, utilizando tampão TRIS-HCl-NaCl 0,15 M, pH 7,5 na concentração de 5% p/v (50 mg/ml), os bioativos solúveis foram concentrados, preferencialmente por liofilização, e utilizados como extrato celular para as atividades biológicas.

Exemplo 2. Prospeção fitoquímica qualitativa e quantitativa do extrato celular

[0026] A extração foi realizada com 10 g da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando 60 ml do solvente Etanol. O extrato obtido foi submetido à identificação de vários fitoquímicos seguindo como protocolo os métodos adotados por Savithramma et al. (Middle-East Journal of Scientific Research, v. 8, p. 579-584, 2011). A partir do extrato produzido, foram realizadas as seguintes análises: Alcalóides, Terpenóides, Esteróides, Taninos, Saponinas, Flavonóides, Fenóis, Cumarinas, Quinonas e Glicosídeos. Os resultados obtidos demonstraram a presença da classe de terpenos.

[0027] O conteúdo fenólico foi determinado usando um método espectrofotométrico a 765 nm (SINGLETON et al., Methods Enzymol, v. 299, p. 152-178, 1999.) A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de GA / g de extrato) (STANKOVIC, Kragujevac. J. Sci., v. 33, p. 63-72, 2011). Os resultados obtidos demonstraram o conteúdo de fenóis totais no extrato de *Chlorella vulgaris* foi de $1,35 \pm 0,18$ mg/g em termos equivalente de ácido gálico.

Exemplo 3. Caracterização das proteínas presentes no extrato celular

[0028] O extrato celular de *C. vulgaris* foi precipitado com sulfato de amônio na faixa de 0-60%, ressuspenso em tampão Tris-HCl-NaCl 0,15M pH 7,5 e carregado em cromatografia de troca aniônica usando a coluna HiTrap™ DEAE FF (0,7 x 2,5 cm) (AKTA™ avant 25, Uppsala, Suécia). A eluição foi realizada a uma taxa de fluxo de 1 mL / min com um gradiente linear de NaCl 0,15-1 M no mesmo tampão. Os perfis de

eluição indicaram dois picos de proteína. O primeiro pico eluiu com NaCl 0,15 M e o segundo com 1,0 M. Apenas o primeiro pico apresentou conteúdo proteico total de $250 \pm 0,005 \mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando Kit BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC), seguindo a metodologia do fabricante. O ensaio de aglutinação de células sanguíneas foi realizado em placas de microtitulação contendo eritrócitos humanos do sistema ABO e de coelho (CORREIA E COELHO et al., Appl. Biochem. Biotech., v.55, p. 261-273, 1995). Os resultados demonstraram que a fração 0-60% apresentou títulos de hemaglutinação com valor >25 para o tipo B do sistema sanguíneo humano ABO. No extrato purificado apenas o pico 0,15M demonstrou atividade para o sangue tipo B, com valor >23 . A proteína eluída pelo primeiro pico foi analisada por eletroforese em gel de 12,5% (p / v) de SDS-PAGE (Laemmli et al., Nature. v.227, p.680-685, 1970) utilizando nitrato de prata como corante, e revelou uma única banda com uma massa molecular aproximada de 36 kDa.

Exemplo 4. Desenvolvimento da formulação

[0029] A formulação é composta por extrato celular da microalga na concentração preferencialmente 25% (p/v), utilizando preferencialmente hidrogel de carbopol. O hidrogel é constituído por carboxivinílico, preferencialmente a 0,8% (p/v), em água purificada, Metilsotiazolinona como conservante, preferencialmente 0,2% (p/v). O pH ajustado, preferencialmente para valores de 7,0-7,5, com Trietanolamina (q.s.p). O produto foi armazenado em recipiente de vidro na geladeira e protegido da luz até sua utilização.

Exemplo 5. Caracterização físico-química e reológica da formulação

[0030] A formulação em gel foi inspecionada quanto a sua homogeneidade, cor, consistência, granulação e separação de fases por inspeção visual após a colocação do gel no recipiente. A formulação em gel possui cor verde, textura suave, levemente turva e homogênea e odor característico do extrato de microalgas.

[0031] O pH das formulações em gel foi determinado usando um medidor de pH digital (Quimis Q400AS, Diadema, São Paulo) mergulhando o eletrodo de vidro completamente no sistema de solução de gel, de modo a cobrir o eletrodo. A medição do pH de cada

formulação foi realizada em triplicata e os valores médios foram calculados. A formulação apresentou valor de pH na faixa de $7,09 \pm 0,07$

[0032] A medição da viscosidade da formulação foi realizada com o viscosímetro Rheology International (Ri: 2: M / H1 / H2, Califórnia, EUA) com fuso tipo S7, velocidade de rotação de 10 a 100 rpm e 100 a 10 com volume de amostra de 60 mL na temperatura de $18 \pm 0,5$ °C. A medição da viscosidade da formulação foi realizada em triplicata e os valores médios foram calculados. A viscosidade desse gel foi decrescente com o aumento da taxa de cisalhamento, mostrou fluxo não newtoniano (afinamento por cisalhamento). Essa viscosidade diminui com o possível comportamento pseudoplástico observado na formulação, confirmando a característica de alta espalhabilidade devido à diminuição da viscosidade ao aplicar determinada força e ao mesmo tempo tem a propriedade de permanecer no local de aplicação.

[0033] A espalhabilidade foi realizada, em triplicata, de acordo com a metodologia descrita por Knorst (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 228p, 1991). Utilizando uma placa de molde de vidro com um orifício central colocado em uma placa de suporte de vidro posicionada sobre papel milimétrico. Cada amostra foi introduzida no orifício da placa de matriz e a superfície foi nivelada com uma espátula. O molde da placa foi removido e uma placa de vidro de peso conhecido foi colocada sobre a amostra. Após um minuto, o diâmetro em posições opostas (como coberto pela amostra) foi lido com o auxílio da escala de papel milimetrado. Posteriormente, calculou-se o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido adicionando sucessivamente outras placas em intervalos de um minuto. Os resultados foram expressos como espalhabilidade da amostra devido ao peso aplicado, de acordo com a equação, que corresponde à média de três determinações:

$$Ei = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

A espalhabilidade do gel de formulação foi considerada alta por ter um baixo tempo de propagação baixo. A capacidade de espalhamento estava na faixa de 14,18 a 28,73 gm.cm/seg e o Índice de dispersão variou entre 4,5 e 6,9 cm.

Exemplo 6. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

[0034] O extrato celular, carbopol e a formulação foram submetidos a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR Agilent Cary 630 FTIR). Os espectros de IV no modo de transmitância foram obtidos na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} a uma taxa de resolução de 16 cm^{-1} e o número de varredura foi 8. O espectro de FT-IR do extrato de *Chlorella vulgaris* a 3187 cm^{-1} indica a presença de estiramento de OH, indica ácidos carboxílicos. O extrato apresentou bandas de absorção na região de 2954 cm^{-1} devido à vibração de estiramento C-H, indica terpenos (MAJUNDER et al., Carbohydr. Polym, v.75, p.150–156, 2009). A banda 1629 cm^{-1} é atribuída ao alongamento de amina (YOKOI et al., J. Ferment. Bioeng., v.85, p.246-249, 1998). O pico observado em 1553 cm^{-1} para alongamento de N-O. O pico em 1401 cm^{-1} foi a contribuição conjunta da vibração de OH e C-H (QUIAN et al., Biomacromolecules, v.7, p. 2722–2727, 2006). Outro pico ao estiramento de 1295 cm^{-1} C-N, indica a presença de aminas aromáticas. O extrato mostrou banda relacionada à vibração de alongamento de carboidratos na região a 1035 cm^{-1} (BREMER E GEESEY, Biofouling, v.3, p.89–100, 1991; BRAMHACHARI E DUBEY, Lett. Appl. Microbiol, v.43, p. 571–577, 2006). De acordo com os resultados da análise de FTIR, a composição do extrato celular de *C. vulgaris* pode estar correlacionada com a atividade de cicatrização. O hidrogel de carbopol e a formulação apresentaram picos localizados em 3332 e 3334 cm^{-1} associados ao grupo hidroxila livre de (–OH); o grupo carbonil (C = O) pode ser determinado 1637 e 1638 cm^{-1} , sugerindo ausência de interação química entre o extrato celular e o carbopol hidrogel, bem como a existência de uma mistura física das duas fases.

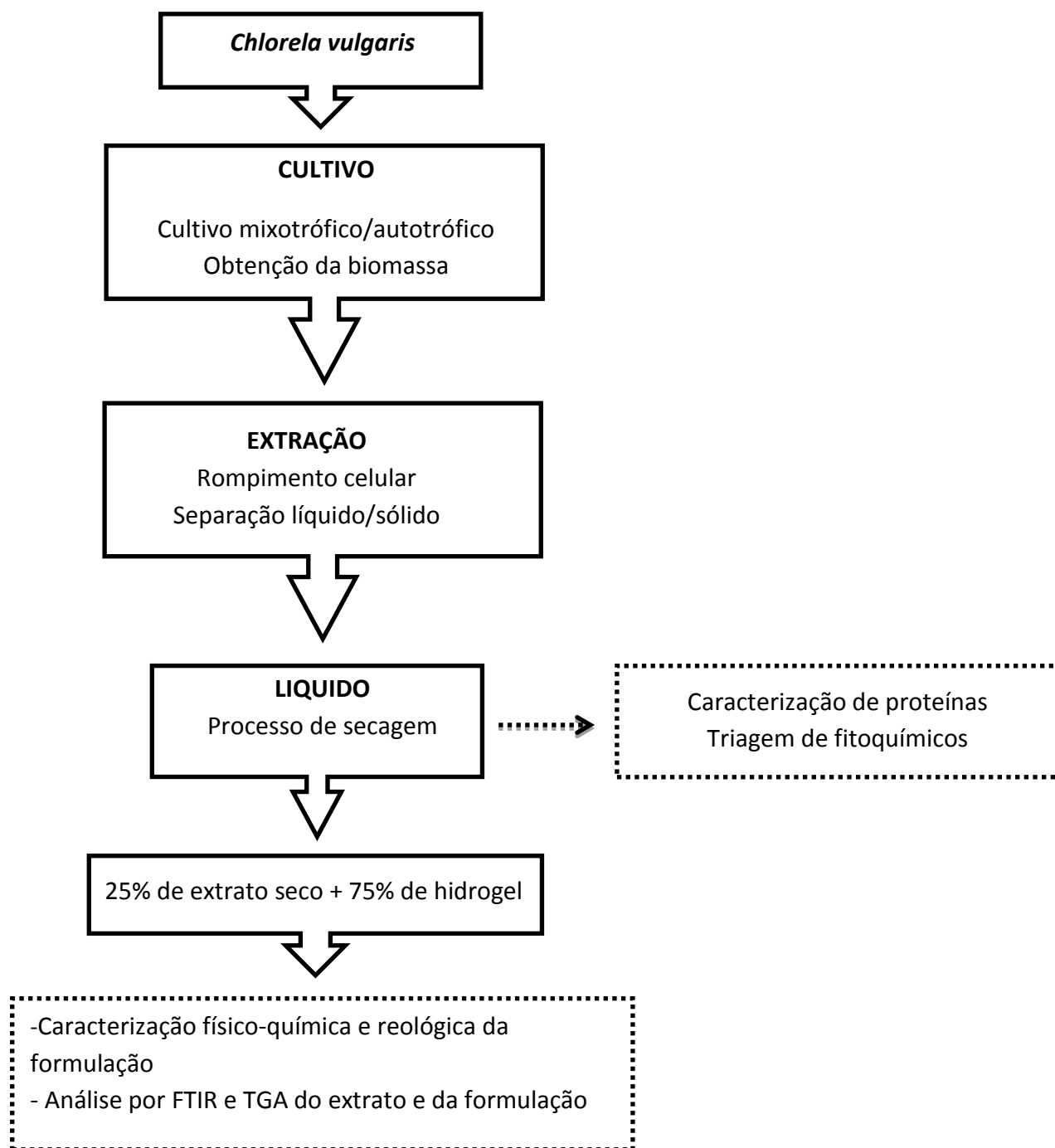
Exemplo 7. Análise Termogravimétrica

[0035] A estabilidade térmica foi avaliada em um analisador termogravimétrico TGA (DTG-60H, Barueri, São Paulo). O estudo foi realizado em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. O extrato, do extrato celular, metilisotiazolinona e carbopol-940 foram analisados em uma faixa de temperatura de 30 a 600 $^{\circ}\text{C}$. De acordo com os resultados do TGA, a porcentagem final de perda de massa do extrato celular foi de 23,56%, ocorrida a 218,64 $^{\circ}\text{C}$. Carbopol-940

tem perda de massa de 19,39%, ocorreu em 301,62%. A perda de massa entre Carbopol-940 e extrato celular foi de 9,07%, ocorreu a 191,52 °C. Carbopol-940 e extrato celular mostraram comportamento similar de degradação térmica. A perda de massa da metilisotiazolinona foi de 94,69%; a curva mostra que a qualidade diminuiu rapidamente até 152,2 °C, principalmente por evaporação da água. Até 128,52 °C, a perda de massa é perceptível entre o extrato celular e a metilisotiazolinona devido à umidade.

REIVINDICAÇÕES

1. “FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA”, **caracterizado por** compreender as etapas de: secagem do extrato celular, constituição e pH da formulação em gel com atividade cicatrizante à base de extrato da microalga, preferencialmente *Chlorella vulgaris*.
2. “FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** proporção entre o extrato celular seco ou aquoso e o veículo gel de polímero carboxivinílico pode variar entre 5 e 80%, preferencialmente 25%.
3. “FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA”, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pela** base constituída preferencialmente por carboxivinílico dissolvido em água, concentração de 0 – 2,0%, preferencialmente na concentração de 0,8% (p/v) de carboxivinílico, metilsotiazolinona na concentração de 0,02 – 0,5% (p/v), preferencialmente a 0,2% (p/v) e trietanolamina (q.s.p).
4. “FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA”, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pela** formulação com pH entre 4,9 – 9,0, preferencialmente 7,0 – 7,5.
5. “FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA”, **caracterizada por** um produto à base de um gel com extrato da microalga *Chlorella vulgaris* com atividade cicatrizante.

DESENHOS**Figura 1**

RESUMO**“FORMULAÇÃO TÓPICA CICATRIZANTE À BASE DE BIOATIVOS DE MICROALGA”.**

A presente patente de invenção refere-se a uma formulação em gel à base do extrato da microalga *Chlorella vulgaris* para o tratamento cicatrizante de lesões cutâneas em geral, particularmente lesões acidentais ou cirúrgicas. A biomassa microalgal é submetida ao rompimento celular por método físico e a fração líquida denominada de extrato celular, preferencialmente concentrada, utilizada para preparação da formulação de hidrogel de carbopol. O pH é fisiologicamente compatível com a alcalinidade de feridas abertas e crônicas, sendo também um pH ótimo para importantes fatores de cicatrização, preferencialmente na faixa de 7,0 - 7,5. As análises de viscosidade e espalhabilidade da formulação demonstraram um comportamento ideal para formulações semissólidas, possuindo alta capacidade de fluidez com alta permanência desta no local da aplicação. O extrato celular, carbopol e a formulação foram submetidos à espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e apresentaram compatibilidade química e física entre o veículo e ativo. O produto apresentou características desejáveis para a forma farmacêutica gel. Este produto tem aplicação na área da Biotecnologia que visa, principalmente, resultados mais rápidos e eficientes na cicatrização e reconstituição tissular..