



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

(21) PI 1100760-5 A2



(22) Data de Depósito: 07/01/2011  
(43) Data da Publicação: 11/02/2014  
(RPI 2249)

(51) Int.Cl.:

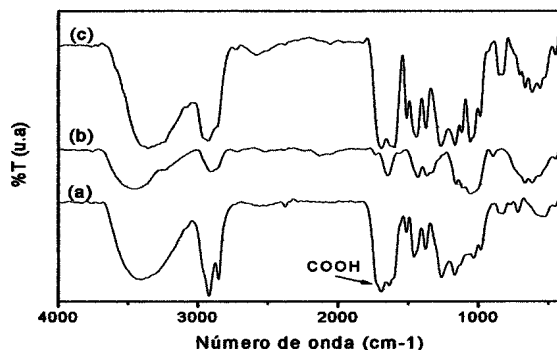
A61L 15/40  
A61L 15/44  
A61K 35/64  
A61K 36/61  
A61K 36/53  
C08L 1/02  
A61P 17/02

(54) **Título:** BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA OBTIDO A PARTIR DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE PRÓPOLIS, BEM COMO SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

(73) **Titular(es):** APIS FLORA INDUSTRIAL E COMERCIAL LTDA

(72) **Inventor(es):** ADALBERTO MIGUEL DE ARAÚJO JÚNIOR, ANDRESA APARECIDA BERRETTA E SILVA, HERNANE DA SILVA BARUD, MANOEL EDUARDO TAVARES FERREIRA, SIDNEY JOSÉ LIMA RIBEIRO, YOUNÉS MESSADDEQ

(57) **Resumo:** BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA OBTIDO A PARTIR DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE PRÓPOLIS, BEM COMO SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS A presente invenção refere-se a biocurativos constituídos por membranas biológicas, contendo diferentes concentrações de Extrato de Própolis, associados ou não aos derivados vegetais de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) ou Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) ou Timo (*Thymus vulgaris*), ou outros derivados naturais de interesse, sendo que tais biocurativos apresentam as atividades: antimicrobiana, frente a microrganismos gram positivos e gram negativos, cicatrizante, antiinflamatória, analgésica e anestésica, além de oferecer reconstrução do material tissular (reepitelização), obtidos por um processo relativamente simples e de baixo custo para produção, que tem como objetivo: auxiliar no tratamento de feridas, lesões de pele, queimaduras, feridas crônicas, inclusive de pacientes diabéticos, estimular a cicatrização de cirurgias, inclusive plásticas, de cunho estético ou não, dentre outras patologias que envolvam a atividade antiséptica, cicatrizante, regeneradora dos tecidos, antiinflamatória, analgésica e anestésica.



## REIVINDICAÇÕES

1) **Processo**, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Insumo Ativo: Extrato de Própolis, preferencialmente o  
5 extrato de própolis padronizado (EPP-AF®);

b. Inclusão do óleo de melaleuca ou alecrim ou timo no processo extrato de própolis;

c. Para produção de celulose bacteriana, segue-se o seguinte procedimento: culturas de *Acetobacter xylinum* são produzidas em  
10 um tempo de cultivo de 12-140 horas a uma temperatura de 25 a 30 °C, sendo que o meio de cultura (meio Schramm-Hestrin) apresenta a seguinte composição básica: glicose 2% (m/v), peptona 0,5% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), fosfato dissódico anidro 0,27% (m/v) e ácido cítrico monohidratado 0,115% (m/v);

15 d. Preparo dos biocurativos:

(i) A membrana de CB é retirada do meio de cultura e devidamente tratada com bases fortes para remoção das bactérias, sendo que amostras de CB hidratadas são  
exaustivamente lavadas para a inclusão do Extrato Própolis  
20 associado ao derivado vegetal selecionado;

(ii) Membranas de celulose bacteriana (hidratadas ou secas) são imersas em soluções de extrato de própolis associadas ao derivado da droga vegetal, em concentrações de 0,1 a 99% (m/m);

(iii) Manter a solução em contato com a membrana durante o período de 12 a 48 horas em temperatura ambiente (20 a 30 °C);

(iv) As membranas de CB contendo própolis são desidratadas em temperatura de 20 a 40 °C até a obtenção de uma película de celulose bacteriana contendo extrato de própolis com aspecto maleável, flexível de coloração âmbar (claro ou escuro) dependendo da concentração de própolis;

(v) Em seguida as membranas de CB contendo própolis são estocadas em recipientes devidamente secos, a temperatura ambiente;

2. **Biocurativo**, caracterizado por ser constituído de membranas biológicas, preferencialmente membrana de celulose bacteriana, contendo diferentes concentrações de extrato de própolis, preferencialmente o extrato padronizado de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>); associados ou não aos derivados vegetais de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) ou Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) ou Timo (*Thymus vulgaris*) em concentrações de 0,1 a 99% (m/m); sendo que tais biocurativos apresentam às atividades antimicrobianas, frente a microrganismos gram positivos e gram negativos,

cicatrizante, antiinflamatória, analgésica e anestésica, além de oferecer reconstituição do material tissular na íntegra.

3. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela ação antimicrobiana do biocurativo ser promovido pela presença das substâncias bioativas da própolis e do derivado da droga vegetal utilizado.

4. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo biocurativo liberar de forma sustentada no leito da ferida os compostos bioativos contidos nos interstícios da rede tridimensional da celulose.

5. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela membrana de celulose bacteriana ser uma membrana biocompatível, apresentando propriedades de aceleração a regeneração e cicatrização dos tecidos.

6. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela membrana de celulose bacteriana ser transparente e dependendo da concentração da solução de própolis empregada, apresenta coloração âmbar.

7. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela cicatrização se dar sem a remoção ou troca do biocurativo do local aplicado.

8. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 2,

caracterizado por apresentar liberação sustentada.

9. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por promover alívio da dor, favorecer a hemostasia, e não permitir a perda de água,

5 10. **Biocurativo**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por formar uma barreira contra agentes externos com ação bloqueadora sobre os raios UVA e UVB.

## RESUMO

### BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA OBTIDO A PARTIR DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE PRÓPOLIS, BEM COMO SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES

#### 5 TERAPÊUTICAS

A presente invenção refere-se a biocurativos constituídos por membranas biológicas, contendo diferentes concentrações de Extrato de Própolis, associados ou não aos derivados vegetais de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) ou Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) ou Timo (*Thymus vulgaris*) ou outros derivados naturais de interesse, sendo que tais biocurativos apresentam as atividades: antimicrobiana, frente a microrganismos gram positivos e gram negativos, cicatrizante, antiinflamatória, analgésica e anestésica, além de oferecer reconstituição do material tissular (reepitelização), obtidos por um processo relativamente simples e de baixo custo para produção, que tem como objetivo: auxiliar no tratamento de feridas, lesões de pele, queimaduras, feridas crônicas, inclusive de pacientes diabéticos, estimular a cicatrização de cirurgias, inclusive plásticas, de cunho estético ou não, dentre outras patologias que envolvam a atividade antiséptica, cicatrizante, regeneradora dos tecidos, antiinflamatória, analgésica e anestésica.

## **BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA OBTIDO A PARTIR DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE PRÓPOLIS, BEM COMO SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

### **5 CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a membranas antimicrobianas e cicatrizantes de celulose bacteriana contendo como substância ativa o extrato de própolis, associado ou não a derivados vegetais ou demais produtos de origem natural, destacando-se sua aplicação  
10 como substituto temporário da pele no tratamento de queimaduras, lesões de pele ou tecidos, feridas crônicas e ferimentos em geral, ou seja, um biocurativo inédito, de alta performance, com características apropriadas para a indução do processo cicatricial, assepsia local, ação antiinflamatória e analgésica, com vantagens  
15 surpreendentes sobre os tratamentos convencionais, cuja aplicação não se restringe ao campo farmacêutico, tendo aplicações diversas na medicina (em suas várias especialidades), odontologia, veterinária, agronomia, materiais médicos ou cirúrgicos, etc.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

20 Vários estudos buscam novas formas de tratamento para a regeneração de lesões cutâneas, pois sabe-se que os tratamentos clássicos das feridas protegem a lesão, porém não promovem a sua

cura. Sabe-se ainda que, nos tratamentos convencionais, há necessidade de administrações repetidas das formas farmacêuticas para se obter êxito terapêutico, situação pouco prática e muito dolorosa. Assim, um sistema de liberação sustentada capaz de liberar o fármaco no leito da ferida pouco a pouco oferece inúmeras vantagens sobre os sistemas convencionais, especialmente em áreas lesionadas, feridas ou queimaduras, uma vez que a aplicação única do biocurativo, evita a manipulação, dor e possibilidade de contaminação da área, mantendo os níveis terapêuticos ótimos com o mínimo de flutuações. Atualmente, busca-se obtenção de produtos que diminuam o tempo de cicatrização e contaminação, promovendo o alívio da dor, situação em que a presente invenção obtém êxito.

No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, acontece um milhão de casos de queimaduras a cada ano, 200 mil são atendidos em serviços de emergência, e 40 mil demandam hospitalização. As queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no Brasil, perdendo apenas para outras causas violentas, que incluem acidentes de transporte e homicídios.

A pele íntegra é a primeira e principal barreira contra a invasão bacteriana, mas em pacientes queimados a pele está

destruída, e conseqüentemente o tecido subjacente exposto é um excelente meio para o desenvolvimento bacteriano. A ocorrência de infecções é, portanto, um dos maiores problemas em queimaduras, ressaltando-se que a septicemia está envolvida em cerca de 50%  
5 das mortes decorrentes de lesões por queimaduras.

No que se refere ao tratamento de feridas (queimaduras, úlceras varicosas, áreas doadoras de enxerto) ainda hoje é necessário um grande avanço para minimizar os sofrimentos do paciente.

10 Os tratamentos clássicos das feridas (ataduras, gaze, por exemplo) protegem a lesão, mas não promovem a cura, além de gerar excelentes condições para a proliferação de germes, requerendo freqüentes trocas, prejudicando, portanto, o processo de cicatrização. Almeja-se a produção de novos curativos que  
15 proporcionem além da proteção da ferida, um efeito terapêutico que auxilie no processo de cura.

As principais características de um substituto ideal da pele são: aderência, permeabilidade ao vapor de água, elasticidade, durabilidade, constituir uma barreira às bactérias, não ser  
20 antigênico, ter ação hemostática, ser de fácil aplicação e manuseio e, finalmente, ser de baixo custo (WOUK et al., 1998).

Atualmente o tratamento de feridas crônicas tem sido realizado por diferentes tipos de materiais (hidrogéis, hidrocolóides, membranas sintéticas ou biológicas), como: Epicel<sup>®</sup> - Genzyme Biosurgey (US\$ 18,90/cm<sup>2</sup>), Alloderm<sup>®</sup> - LifeCell Inc. (US\$ 10,60/cm<sup>2</sup>), Apligraf<sup>®</sup> - Organogenesis Inc. (US\$ 25,60/cm<sup>2</sup>), Biobrane<sup>®</sup> - Mylan Lab. (US\$ 0,90/cm<sup>2</sup>), Integra<sup>®</sup> - Integra LifeScience Corp. (US\$ 6,00/cm<sup>2</sup>), sendo que destas, as três primeiras são relacionadas a derme de cadáver e colágeno bovino adicionado de queratinócitos e fibroblastos, e as duas últimas são de origem sintética, como (i) nylon e silicone e (ii) glicosaminoglicanas e silicone. Biomateriais importados, que encarecem o processo de tratamento, além de muitos deles apresentarem baixo nível de aderência ao leito da ferida, e também requerem trocas freqüentes, além da possibilidade de contaminação.

Além dos anteriormente apresentados, utiliza-se compostos a base de prata para tais tratamentos, como pomadas e cremes a base de sulfadiazina de prata, além de prata nanoparticulada, como observado no pedido de patente PI0513967-8. Muito embora os resultados desses materiais sejam satisfatórios, uma limitação ocorre, pois, se trabalha com partículas de metais que podem ser tóxicas ao organismo humano.

As membranas/películas de celulose bacteriana (CB) têm surgido como o curativo mais eficiente, pois possui propriedades superiores quando comparado aos demais, além de apresentar um custo extremamente menor. As vantagens em se utilizar a película de CB como um curativo biológico tem se confirmado em mais de 5 300 tratamentos (CZAJA, et al., 2007).

Membranas de biocelulose podem ser obtidas pela biosíntese da bactéria *Acetobacter xylinum* em meio de cultura estático que apresentem como fonte nutricional glicose. Membranas de CB são 10 obtidas na forma de um hidrogel altamente hidratado (99% água), sendo quimicamente pura (livre de lignina, hemicelulose, e pectinas). Apresenta cadeias de celulose nanométrica, organizadas em um arranjo estrutural tri-dimensional, o qual gera um sistema altamente cristalino (60-80%), com excelente força mecânica. Essa 15 rede de fios nanométricos lhe confere enorme área superficial, surpreendente capacidade de absorção e retenção de água, boa elasticidade, além de ser facilmente moldável, características desejadas para um curativo ideal. É um produto biodegradável, biocompatível, atóxico e não alergênico.

20 Apesar de a celulose bacteriana atuar como curativo na cicatrização de feridas crônicas e queimaduras, sua aplicação em feridas contaminadas é limitada, já que ela não possui atividade

antimicrobiana.

Entretanto, como a CB é obtida "*in natura*" na forma de um hidrogel altamente intumescido e poroso, uma possibilidade trata-se da inserção de compostos orgânicos/inorgânicos em sua estrutura com a finalidade de produzir a atividade desejada.

Com o objetivo de produzir um biocutativo que atue com a mesma eficácia dos outros materiais outrora desenvolvidos, e ainda com a vantagem de ter sua origem natural, uma possibilidade trata-se da incorporação de própolis a membranas de CB, produzindo um novo biocurativo.

Atualmente tem sido identificados mais de 300 constituintes da própolis, sendo que a maioria é composta por polifenóis como os flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos, cetonas e outros. A própolis tem sido utilizada desde tempos antigos. De maneira geral, ela é elaborada pelas abelhas a partir de resinas de broto, botões florais e outras partes de tecidos vegetais. A própolis bruta encontra-se no estado sólido a temperatura ambiente e suas propriedades físicas variam de uma amostra para outra, implicando a uma elevada variação de seus princípios ativos e apresentando uma composição química variada e complexa, dependendo do local onde a própolis é colhida. Sabe-se que as propriedades antimicrobiana e a imunomoduladora da própolis não variam com a

sua época de colheita, todavia é importante saber sobre a concentração dos princípios ativos e a padronização dos mesmos para a preparação de uma forma farmacêutica cujo princípio ativo é de origem vegetal. Dentre os compostos da própolis que

5 apresentam propriedades farmacológicas destacam-se os flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), os quais se caracterizam por apresentarem em suas estruturas químicas pelo menos um anel aromático ligado diretamente a uma ou mais hidroxilas. Suas propriedades são explicadas, em parte, pela

10 capacidade de proteção contra a ação agressiva dos radicais livres. Há décadas diversas atividades biológicas têm sido atribuídas à própolis, destacando-se a atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, anticarcinogênica, anestésica, citostática, imunoestimulante e cicatrizante. Portanto, os compostos

15 bioativos da própolis são agentes bacteriostáticos, pois diminuem o crescimento de microorganismos patogênicos e bactericidas, já que em muitos casos, matam tais microrganismos, bem como a penetração dos mesmos no organismo evitando infecções invasivas e retardo no processo de cura de queimaduras. A própolis é uma

20 boa alternativa para uso antimicrobiano em queimaduras, pois ela não apresenta toxicidade aguda e seus compostos são

biodegradáveis, fator que é importante quando se fala em questões ambientais.

Portanto, aliar as propriedades antimicrobianas da própolis aos curativos mostra ser uma interessante forma de tratamento de

5 úlceras de pressão, lesões, feridas e queimaduras. Já existe no mercado um curativo hidrossolúvel impregnado de própolis, o qual é comercializado como gaze não aderente. Sua indicação é para queimadura de segundo grau superficial ou profunda, para uso em

10 área doadora e receptora de enxertos dermo-cutâneos e em lesões traumáticas, porém a presente proposta se mostra muito mais poderosa em função da capacidade de absorção das biomembranas com relação ao extrato de própolis, às características do biocurativo no tecido lesado, já que esta membrana apresenta flexibilidade, aderência, é permeável ao

15 oxigênio dando todas as condições ideais para a estimulação da repitelização tissular, além da possuir além das características das biomembrana anteriormente citadas, as propriedades impressionantes da própolis, quais sejam, sua atividade antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatória, analgésica e

20 anestésica, dentre outras que não se aplicam ao presente caso.

O método de aplicação desses curativos segue um procedimento padrão que compreende as seguintes etapas:

- a) assepsia do local da lesão com anti-séptico;
  - b) remoção do tecido desvitalizado;
  - c) posição do curativo sobre a área lesada;
  - d) retirar as bolhas de ar e o excesso de sangue com gazes
- 5 embebidas por sero fisiológico, para aumentar a aderência do curativo à pele;
- e) aplicação do curativo;

No entanto, os curativos convencionais devem ser substituídos a cada 12 ou 24 horas, devido à quantidade de

10 secreção e exsudado produzida. Portanto, eles apresentam desvantagens quanto ao método de aplicação e à frequência necessária de troca de curativo, o que não acontece na invenção ora requerida, já que não requer substituição, é caracterizado como um sistema de liberação sustentado de própolis, mantendo assim

15 níveis ótimos de princípios ativos nas primeiras horas do tratamento, além de ser permeável e não manter excesso de exsudatos na região, que dificultam o processo cicatricial.

Há na literatura uma série de pesquisas envolvendo biocurativos e outras formas farmacêuticas, sendo que tais

20 pesquisas refletem a importância atual de se buscar formas de evitar uma proliferação microbiana em processos infecciosos ou como medidas profiláticas de assepsia. Atualmente, para o

tratamento de feridas crônicas, merece destaque a nitrofurasona e a sulfadiazina de prata, sendo que esta última apresenta amplo espectro de ação.

Todavia ambos os medicamentos podem proporcionar  
5 reações adversas e ter algumas desvantagens. A nitrofurasona, por exemplo, causa dermatite alérgica de contato e pode ter seu efeito reduzido na presença de sangue e matéria orgânica. Já a sulfadiazina pode proporcionar sensação de queimadura, urticária, prurido e necrose cutânea. Por apresentar pouca solubilidade em  
10 água, sua absorção também é limitada.

Nesse sentido, persiste a necessidade de um biocurativo que tenha ação antimicrobiana, o que impediria a formação de biofilmes infectados quando bactérias são aderidas na superfície da pele; possua características próximas à da pele, que seja eficiente,  
15 que acelere o processo de regeneração tecidual e que necessite de menor frequência de troca. O biofilme é uma carga metabólica imposta pela bactéria no leito da ferida. Além de competir com as células normais por oxigênio e nutrientes, a presença do biofilme compromete e lentifica várias fases do processo de cura da ferida.  
20 Daí a importância de evitar sua formação em processos regenerativos.

Por outro lado, alguns documentos de patentes revelam composições à base de própolis impregnadas em materiais têxteis ou fitas para a cicatrização de feridas, conforme pode ser observado através dos documentos RU2319487 e CN2912647. No entanto estes documentos, ao contrário do invento ora proposto, não utilizam a celulose bacteriana em conjunto com a própolis, cuja combinação apresenta eficiência no tratamento e cicatrização de lesões em peles ou tecidos, como queimaduras, úlceras de pressão, feridas crônicas, entre outras, sem a proliferação de bactérias. A vantagem do uso da celulose bacteriana está em seu aspecto transparente e na não necessidade de troca do curativo, bem como por apresentar liberação sustentada.

### **OBJETIVOS DA INVENÇÃO**

Mais especificamente, a presente invenção se caracteriza por biocurativos, constituídos por membranas biológicas, preferencialmente membrana de celulose bacteriana, contendo diferentes concentrações de Extrato de Própolis, preferencialmente o extrato de própolis padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>), associados ou não aos derivados vegetais de *Melaleuca* (*Melaleuca alternifolia*) ou Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) ou Timo (*Thymus vulgaris*) ou outros derivados naturais de interesse, sendo que tais biocurativos apresentam as atividades: (i) antimicrobiana, frente a

microrganismos gram positivos e gram negativos, (ii) cicatrizante, (iii) antiinflamatória, (iv) analgésica e anestésica, além de oferecer reconstituição do material tissular (reepitelização), obtidos por um processo de obtenção relativamente simples e de baixo custo para

5 produção, que tem como objetivo: auxiliar no tratamento de feridas, lesões de pele, queimaduras, feridas crônicas, inclusive de pacientes diabéticos, estimular a cicatrização de cirurgias, inclusive plásticas, de cunho estético ou não, dentre outras patologias que envolvam a atividade antiséptica, cicatrizante, regeneradora dos

10 tecidos, antiinflamatória, analgésica e anestésica, como previamente informado. A presente invenção não se restringe ao campo farmacêutico, tendo aplicações diversas na medicina (em suas várias especialidades), odontologia, veterinária, agronomia, materiais médicos ou cirúrgicos, etc.

## 15 **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A figura 1 apresenta a Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho de: a) Própolis; b) CB e c) CB hidratada contendo própolis.

A figura 2 ilustra o Difratoograma de Raios X de: a) CB; b) CB hidratada contendo 1,2% própolis; b) CB hidratada contendo 2,4% própolis; b) CB hidratada contendo 3,6% própolis.

20

A figura 3 demonstra a Microscopia Eletrônica de Varredura de: (a) CB; (b) CB contendo própolis.

A figura 4 ilustra Marcador químico p-cumárico.

A figura 5 ilustra o Marcador químico isosakuranetina.

5 A figura 6 ilustra o Marcador químico artepelin c.

## **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

O invento refere-se a membranas biológicas antimicrobianas e cicatrizantes, preferencialmente de celulose bacteriana, contendo como substância ativa o extrato de própolis, preferencialmente o  
10 extrato padronizado de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>), associado ou não a derivados vegetais ou demais produtos de origem natural, destacando-se sua aplicação como substituto temporário da pele no tratamento de queimaduras, lesões de pele ou tecidos, feridas crônicas e ferimentos em geral, ou seja, um biocurativo inédito, de  
15 alta performance, com características apropriadas para a indução do processo cicatricial, assepsia local, ação antiinflamatória e analgésica, com vantagens surpreendentes sobre os tratamentos convencionais.

O processo de obtenção da invenção ora requerida,  
20 caracteriza-se pelas seguintes etapas:

a. Insumo Ativo: Extrato de Própolis, preferencialmente o extrato padronizado de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>);

b. Solubilização do óleo de melaleuca ou alecrim ou timo ou outro derivado de origem vegetal ou natural que possa agregar atividade de interesse no produto (em concentração que pode variar de 0,1 a 99%, conforme a necessidade), no extrato padronizado de própolis previamente apresentado, com auxílio de algum adjuvante, se necessário (emulsionante, solubilizante, ou outro);

c. Para produção de celulose bacteriana, segue-se o seguinte procedimento: culturas de *Acetobacter xylinum* são produzidas em um tempo de cultivo de 24-140 horas a uma temperatura de 25 a 30 °C. O meio de cultura (meio Schramm-Hestrin) apresenta a seguinte composição básica: glicose 2% (m/v), peptona 0,5% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), fosfato dissódico anidro 0,27% (m/v) e ácido cítrico monohidratado 0,115% (m/v).

d. Preparo dos biocurativos:

(i) A membrana de CB é retirada do meio de cultura e devidamente tratada com bases fortes para remoção das bactérias. Amostras de CB hidratadas são exaustivamente lavadas para a inclusão do Extrato de Própolis, preferencialmente o extrato de própolis padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>) associado ao derivado vegetal selecionado.

(ii) Membranas de celulose bacteriana (hidratadas ou secas) são imersas em soluções de Extrato de Própolis, preferencialmente

o extrato de própolis padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>), associadas ao derivado da droga vegetal, em concentrações de 0,1 a 99% (m/m);

(iii) Manter a solução em contato com a membrana durante o período de 12 a 48 horas em temperatura ambiente (20 a 30 °C);

5 (iv) As membranas de CB contendo própolis são desidratadas em temperatura de 20 a 40 °C até a obtenção de uma película de celulose bacteriana contendo extrato de própolis com aspecto maleável, flexível de coloração âmbar (claro ou escuro) dependendo da concentração de própolis.

10 (v) Em seguida as membranas de CB contendo própolis são estocadas em recipientes devidamente secos, a temperatura ambiente.

Na membrana de celulose bacteriana da presente invenção, a ação antimicrobiana do biocurativo é promovido pela presença das  
15 substâncias bioativas da própolis e do derivado da droga vegetal utilizado, de acordo com o perfil químico e padronização dos compostos da própolis conforme descrito na patente (PI0405483-0). Quando em contato com a ferida, o biocurativo libera de forma sustentada (figura 3) no leito da ferida os compostos bioativos  
20 contidos nos interstícios da rede tridimensional da celulose. A membrana de celulose bacteriana deve ser previamente umedecida

em soro fisiológico, preferencialmente para uso tópico em feridas crônicas e queimaduras.

É importante salientar que o uso da própolis e de derivados das drogas vegetais tem inúmeras vantagens, pois os mesmos não são tóxicos, além de não induzirem resistência microbiana, ao contrário do que acontece com os antibióticos convencionais. Devido à prescrição ampla e indiscriminada de antibióticos, os patógenos têm se tornado cada vez mais resistentes as ações de tais agentes. A própolis e os derivados vegetais, portanto, são agentes profiláticos e terapêuticos muito úteis na prevenção da colonização de feridas por microorganismos (gram positivos e gram negativos) os quais, quando presentes nos ferimentos, lesões ou queimaduras, retardam o processo cicatricial e, portanto, a cura.

Sendo a membrana de celulose bacteriana uma membrana biocompatível, ela também apresenta propriedades de acelerar a regeneração e cicatrização dos tecidos. Por ser transparente, é possível acompanhar a evolução do processo de cura sem remover o curativo. Apesar da concentração de própolis usada, quanto mais concentrada a solução de própolis empregada, mais intensa fica a cor âmbar característica do biocurativo, entretanto o mesmo permanece com boa transparência, permitindo a avaliação do processo cicatricial sem a remoção do mesmo do local aplicado.

Uma das vantagens desses biocurativos é que eles apresentam liberação sustentada, uma vez na pele, não precisam ser trocados, diferente dos curativos utilizados atualmente. Durante todo o processo de cicatrização, a membrana CB contendo própolis  
5 permanece sobre a pele e à medida que ocorre a regeneração tecidual, há desligamento da superfície cutânea. Além disso, em casos de queimaduras de primeiro, segundo e terceiro grau, a aplicação da membrana CB contendo própolis promove alívio da dor, favorece a hemostasia, não permite perda de água, forma uma  
10 barreira contra agentes externos e tem ação bloqueadora sobre os raios UVA e UVB.

Essas propriedades tornam a membrana útil não só no tratamento de feridas crônicas e queimaduras, mas também em outras patologias que envolvem dificuldade de cicatrização e  
15 regeneração de tecidos, tais como diabetes, áreas doadoras de enxerto e outras. Em pacientes idosos, a presente invenção mostra ter um importante efeito, pois tais pacientes apresentam uma maior dificuldade fisiológica no processo de cicatrização devido à idade avançada.

## 20 EXEMPLOS

EXEMPLO 1 – Biocurativos de Celulose Bacteriana contendo Extrato de Própolis e/ou derivado de origem vegetal ou natural

Os biocurativos foram obtidos conforme descrito abaixo:

a. Insumo Ativo: Extrato de Própolis, preferencialmente o extrato de própolis padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>), caracterizado químicamente e biologicamente, como descrito no processo de patente (PI0405483-0), em diversas concentrações e diluições. O extrato própolis utilizado foi fornecido pela empresa Apis Flora Indl. Coml. Ltda., sendo que o mesmo foi obtido após criterioso estudo da matéria-prima proveniente de diferentes regiões do Brasil;

b. Solubilização do óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) ou alecrim (*Rosmarinus officinalis*) ou timo (*Thymus vulgaris*) ou Babosa (*Aloe vera*) ou outro derivado de origem vegetal ou natural, no extrato padronizado de própolis previamente apresentado (a fim de melhorar a *performance* dos biocurativos de própolis ou acrescentar outras atividades biológicas ao mesmo);

c. Para produção de celulose bacteriana, segue-se o seguinte procedimento: culturas de *Acetobacter xylinum* são produzidas em um tempo de cultivo de 24-140 horas a uma temperatura de 25 a 30 °C. O meio de cultura (meio Schramm-Hestrin) apresenta a seguinte composição básica: glicose 2% (m/v), peptona 0,5% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), fosfato dissódico anidro 0,27% (m/v) e ácido cítrico monohidratado 0,115% (m/v);

d. Preparo dos biocurativos:

(i) A membrana de CB é retirada do meio de cultura e devidamente tratada com bases fortes para remoção das bactérias. Amostras de CB hidratadas são exaustivamente lavadas para a inclusão do Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF) associado  
5 ao derivado vegetal selecionado.

(ii) Membranas de celulose bacteriana (hidratadas ou secas) são imersas em soluções de Extrato de Própolis, preferencialmente o extrato de própolis padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>), associadas ao derivado da droga vegetal, em concentrações de 0,1 a 99% (m/m);

10 (iii) Manter a solução em contato com a membrana durante o período de 12 a 48 horas em temperatura ambiente (20 a 30 °C);

(iv) As membranas de CB contendo própolis são desidratadas em temperatura de 20 a 40 °C até a obtenção de uma película de celulose bacteriana contendo extrato de própolis com aspecto  
15 maleável, flexível de coloração âmbar (claro ou escuro) dependendo da concentração de própolis.

(v) Em seguida as membranas de CB contendo própolis são estocadas em recipientes devidamente secos, a temperatura ambiente;

20 EXEMPLO 2 – Caracterização Química dos Biocurativos – membranas de celulose bacteriana contendo Extrato de Própolis

Os biocurativos (compósitos) descritos no exemplo 1, foram

caracterizados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR), difratometria de raio-x (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), entre outras. A Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho permite a identificação qualitativa de grupos funcionais presentes nos compósitos desenvolvidos. A figura 1 apresenta espectro de Infravermelho representativo para a própolis, CB e uma membrana hidratada de CB contendo própolis, respectivamente. Algumas bandas que caracterizam a própolis no espectro de IV, são absorções referentes à presença de ligação dupla C=C ( $\nu_{\max}$  1641  $\text{cm}^{-1}$ ), de grupos carboxila ( $\nu_{\max}$  1703  $\text{cm}^{-1}$ ) e hidroxila ( $\nu_{\max}$  3487  $\text{cm}^{-1}$ ). As principais atribuições que caracterizam a CB são: 3500  $\text{cm}^{-1}$ : estiramento OH; 2900  $\text{cm}^{-1}$ : estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico  $\text{CH}_2$ ; 2700  $\text{cm}^{-1}$ : estiramento simétrico  $\text{CH}_2$ ; 1640  $\text{cm}^{-1}$ : deformação OH; 1400  $\text{cm}^{-1}$ : deformação  $\text{CH}_2$ ; 1370  $\text{cm}^{-1}$ : deformação  $\text{CH}_3$ ; 1340  $\text{cm}^{-1}$ : deformação OH e 1320-1030  $\text{cm}^{-1}$ : deformação CO. Basicamente as membranas de CB contendo própolis apresentam espectros que podem ser considerados como a soma do espectro da CB e própolis, evidenciando a formação de um material compósito. A banda localizada ao redor de 1703  $\text{cm}^{-1}$  característica de grupos carboxila ( $\nu_{\max}$  1703  $\text{cm}^{-1}$ ), presente exclusivamente na própolis, é observada claramente nas

membranas de CB contendo própolis. A figura 2 mostra o Difratoograma de raios X para a CB e CB contendo própolis. Os picos observados em 15 e 22,5 °C referem-se a CB, referentes as contribuições das fases 1 $\alpha$  e 1 $\beta$ . Pode se inferir que devido à

5 presença da própolis na CB, ocorre uma mudança no perfil do difratograma, ou seja, uma diminuição gradual na cristalinidade da CB com o aumento da concentração de própolis. As figuras 3 (a) e (b) apresentam resultados de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para CB e membrana de CB contendo própolis. A figura 3 (a)

10 mostra a morfologia da superfície da CB, que é caracterizada por uma malha compacta, formada por uma rede bem entrelaçada de fibras longas de ordem nanométrica (“nanoceluloses”). A figura 3 (b) referente a CB contendo própolis mostra o recobrimento homogêneo das fibras de CB, que pode ser atribuído a presença da

15 própolis. A caracterização do perfil químico qualitativo e quantitativo da própolis nos biocurativos não está apresentada neste pedido por já ter sido descrito no processo de patente do Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF<sup>®</sup>) (PI 0405483-0 – Publicado na Revista de Propriedade Industrial n. 1778 de 01/02/2005) – insumo ativo dos

20 presentes biocurativos.

EXEMPLO 2 – Biocurativos de Celulose Bacteriana contendo Extrato Padronizado de Própolis (CB-própolis) de Liberação Sustentada

Para a avaliação do perfil de liberação do extrato padronizado de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>) dos biocurativos utilizou-se um Dissolutor Sotax AT7 *smart* equipado com o aparato 5 - pá sobre disco, aparato este previsto pelas farmacopéias americanas e europeias para avaliação da liberação de fármacos em sistemas transdérmicos. Para o meio de dissolução a temperatura indicada pela literatura é  $32 \pm 0,5$  °C, pH 5,0 à 6,0 e rotação das pás a 100 rpm. (SIEWERT et al, 2003). Estipulou-se também um volume mínimo de meio para cuba, sendo este 500 mL. De acordo com as condições *sink* determinadas a partir da solubilidade do extrato de própolis utilizado na produção das biomembranas e o volume mínimo de 500,0 mL em cada cuba, utilizou-se o meio 50% de etanol/tampão fosfato pH 6,0. Realizou-se a desgaseificação do meio logo após seu preparo, para que bolhas de ar não interferissem na taxa de dissolução, alterando assim, os resultados. As amostras de todas as biomembranas foram cortadas em 4,0 cm de diâmetro e adaptadas ao aparato de forma a permanecer com uma superfície de liberação em contato com o meio. Durante o teste de dissolução, alíquotas de 5,0 ml foram retiradas com o auxílio de

uma pipeta graduada de 5,0 ml, nos seguintes tempos: 10min, 30min, 1h, 2h, 3h, 6h e 24h. Lembrou-se sempre de adicionar a mesma quantidade de meio logo após a retirada, para manter o volume constante. Para análise das amostras em cromatografia líquida de alta eficiência, prepararam-se as alíquotas de modo a obter soluções com concentrações ideais para injeção em CLAE. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 4, 5 e 6, e demonstram, através dos marcadores escolhidos para esse ensaio, quais sejam, ácido p-cumárico (composto polar), isossakuranetina (flavonóide) e artepellin C (composto apolar) que os biocurativos, independente das concentrações de própolis dos compósitos, apresentam liberação sustentada, demonstrando que os biocurativos não precisam ser reaplicados, ou seja, apresentam a imensa vantagem de não precisarem de troca, evitando transtornos para os pacientes e alívio da dor.

### EXEMPLO 3 – Atividade Antimicrobiana dos Biocurativos de CB-própolis

Estudos mostram que microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobactérias são patógenos importantes em infecções de feridas cirúrgicas e de queimaduras. Dentre tais microorganismos, avaliou-se a atividade antimicrobiana das membranas CB-própolis em

cepas de *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923, *S. aureus* MRSA (meticilina resistente) ATCC 43300 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, figura 4, sendo que tais microrganismos se mostraram sensíveis aos biocurativos de celulose bacteriana contendo Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF<sup>®</sup>) nas concentrações de própolis contidas nos biocurativos e formaram-se halos de inibição demonstrando a atividade dos biocurativos nesses sistemas. A avaliação da atividade antimicrobiana dos biocurativos foi realizada em duplicata, utilizando o método da difusão em ágar preconizado pelo CLSI (NCCLS, 2003b), frente aos seguintes microrganismos: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 14990, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922. Foi preparada uma suspensão de cada microrganismo (cultura de 24 horas) em solução fisiológica a 0,85% com turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 1.108UFC/ml). As suspensões foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm considerando as absorbâncias entre 0,08 a 0,1. Com o auxílio de um swab de algodão esterilizado, cada suspensão foi semeada em placas de Petri (90x15mm) contendo ágar Mueller Hinton. Os biocurativos cortados em discos foram distribuídos em pontos equidistantes na superfície do ágar Mueller Hinton. Em

seguida, 5µl de solução fisiológica a 0,85% esterilizada foram adicionados na superfície de cada biocurativo. As placas foram incubadas a 36 °C por 18 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição foram mensurados com o auxílio de uma régua milimetrada. Além disso, o estudo também foi realizado para alguns outros derivados vegetais, como melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), romã (*Punica granatum*) e barbatimão, demonstrando que a melaleuca apresenta poderosa ação frente aos microrganismos gram negativos, enquanto os demais demonstram atividade frente aos gram positivos.

#### EXEMPLO 4 – Atividade Cicatrizante da CB-própolis

O extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF<sup>®</sup>), já foi extensivamente estudado quanto as suas atividades biológicas, como: atividade antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatória, analgésica e anestésica, antiviral, etc. como já descrito na patente do Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF<sup>®</sup>), insumo ativo da presente invenção (PI 0405483-0 – Publicado na Revista de Propriedade Industrial n. 1778 de 01/02/2005), além dos dados já apresentados na patente do mesmo insumo ativo em uma aplicação particular da invenção: “Gel termorreversível de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>) e respectivo processo de fabricação, com atividade anti-séptica e

cicatrizante para tratamento de queimaduras, lesões de pele e outros”, onde demonstra-se a aplicação relativa a indução da cicatrização do insumo ativo.

Figura 1

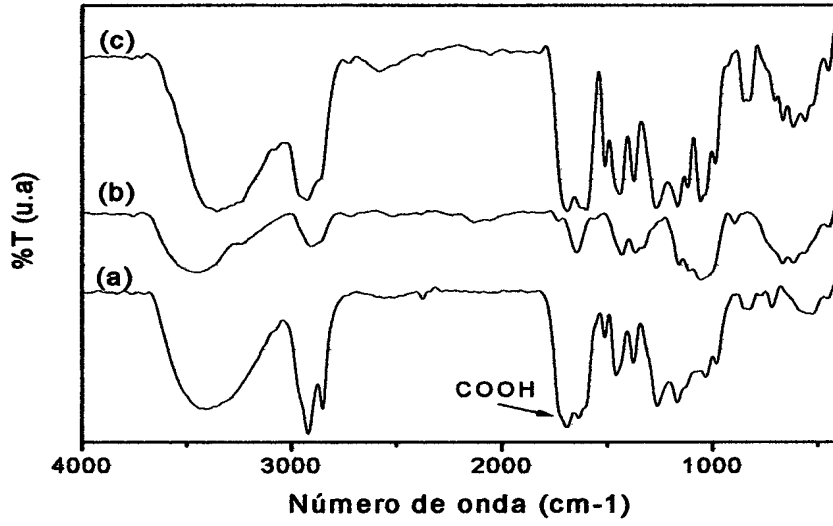


Figura 2

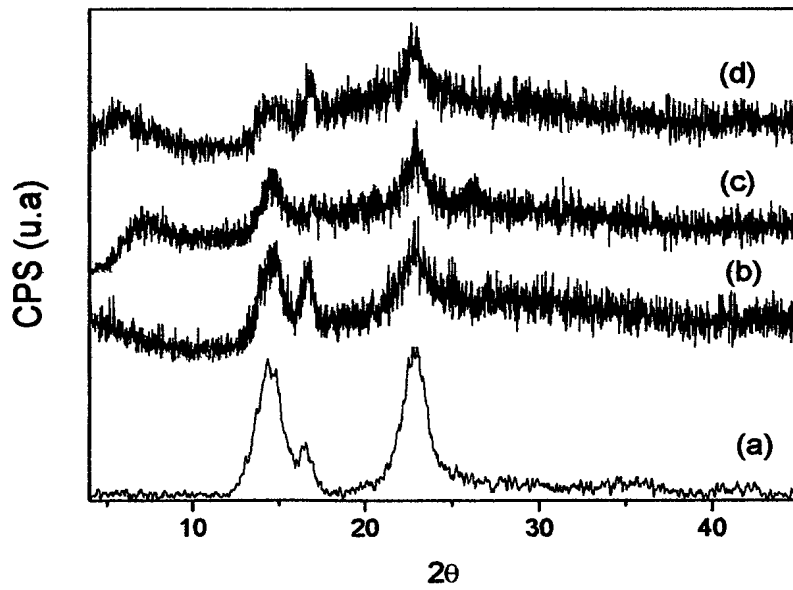


Figura 3

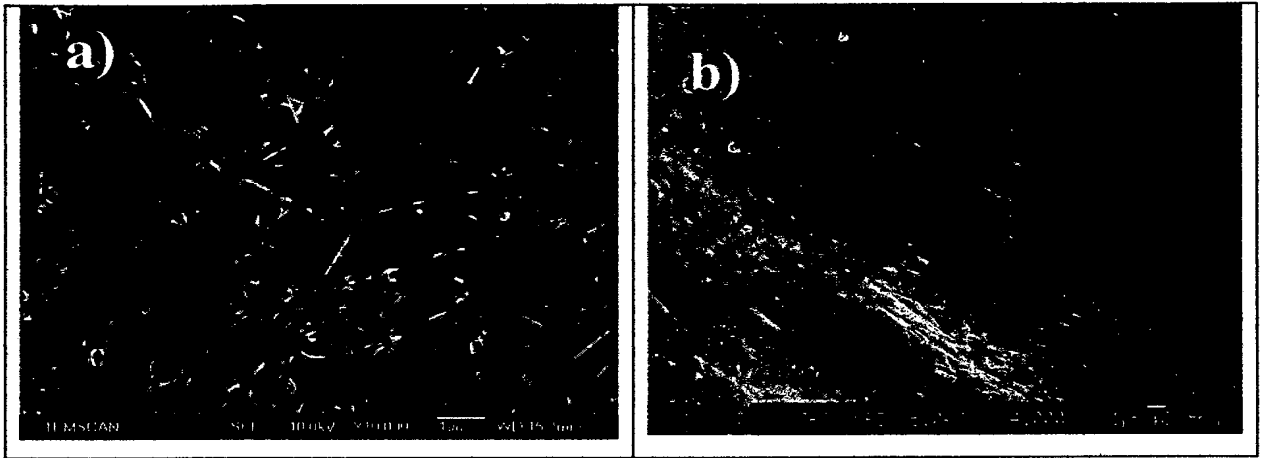


Figura 4

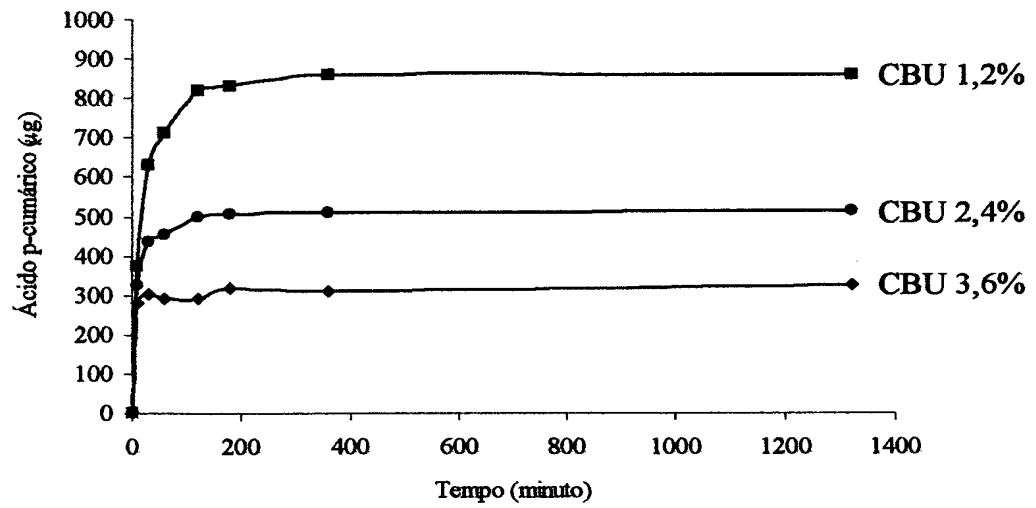


Figura 5

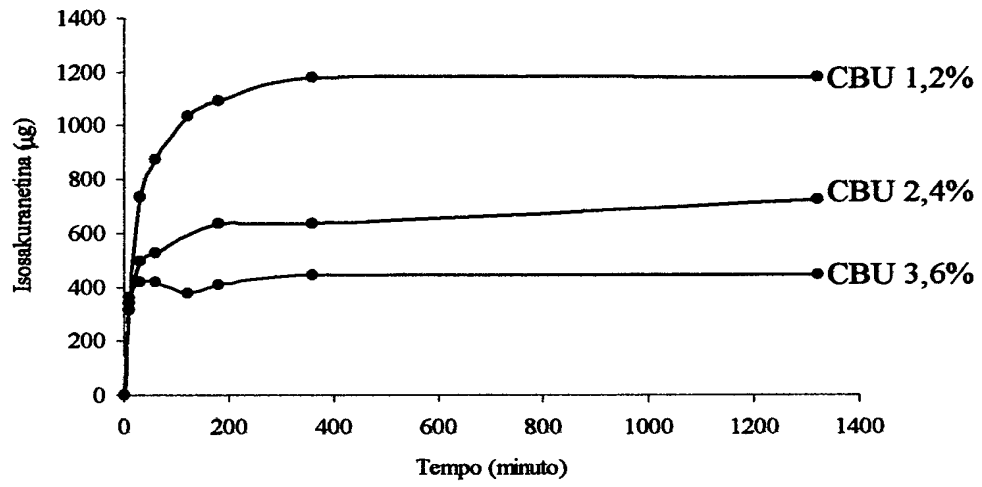


Figura 6

