



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102023006737-9 A2

(22) Data do Depósito: 11/04/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
22/10/2024

(54) Título: PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE CONTENDO TRIANCINOLONA, BIOCURATIVOS E USO PARA APLICAÇÃO MÉDICA E VETERINÁRIA

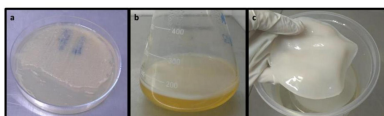
(51) Int. Cl.: A61L 15/28; A61L 15/44.

(52) CPC: A61L 15/28; A61L 15/44.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO; ASSOCIAÇÃO SÃO BENTO DE ENSINO; UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF; BIOSMART NANOTECHNOLOGY LTDA.

(72) Inventor(es): FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS; HERNANE DA SILVA BARUD; HÉLIDA GOMES DE OLIVEIRA BARUD; LUCAS NOBORU FATORI TREVIZAN; JULIANA REGINA PEIRÓ; DANIELA SCANTAMBURLO DENADAI; MERIELEN SILVA ALBUQUERQUE; MARIANA ZACARIN GUIATI; PAULA ALESSANDRA DI FILIPPO.

(57) Resumo: PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE CONTENDO TRIANCINOLONA, BIOCURATIVOS E USO PARA APLICAÇÃO MÉDICA E VETERINÁRIA. O presente pedido de patente compreende um biocurativo de biocelulose contendo triancinolona e o uso do biocurativo para aplicação médica e veterinária. A presente invenção pertence ao campo de tratamento de feridas, particularmente na área médica veterinária direcionada ao tratamento de lesões cutâneas em animais. Refere-se à utilização de curativos de celulose bacteriana aplicados sobre lesões de animais ocasionadas pela perda de tecido cutâneo, o qual há a necessidade de tratamento preventivo prévio ao agravamento do quadro clínico do animal doente.



**PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE
CONTENDO TRIANCINOLONA, BIOCURATIVOS E USO PARA APLICAÇÃO
MÉDICA E VETERINÁRIA.**

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente compreende um biocurativo de biocelulose contendo triancinolona e o uso do biocurativo para aplicação médica e veterinária.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence ao campo de tratamento de feridas, particularmente na área médica veterinária direcionada ao tratamento de lesões cutâneas em animais. Refere-se à utilização de curativos de celulose bacteriana aplicados sobre lesões de animais ocasionadas pela perda de tecido cutâneo, o qual há a necessidade de tratamento preventivo prévio ao agravamento do quadro clínico do animal doente.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[003] O impacto das feridas crônicas na espécie equina é desconhecido, visto que na maioria dos animais estas feridas são cuidadas pelo seu tratador, prejudicando o seu registro. Porém, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) afirma que uma incidência de 16 a 27% em cavalos até 20 anos do procedimento de eutanásia devido a ferimentos, feridas ou traumas. Semelhanças nas características do tecido cutâneo, na cicatrização e nas complicações durante o processo cicatricial entre cavalos e humanos, sugerem o cavalo como um modelo fisiologicamente relevante para o estudo dos mecanismos envolvidos no reparo de feridas. Humanos têm pele firmemente aderida ao tecido conjuntivo subjacente e, como resultado, dependem da epitelização para a cicatrização da superfície primária de feridas cutâneas, seguido por cicatrização dérmica por granulação estromal e migração e contração de miofibroblastos, o mesmo é observado na cicatrização de pele nos membros distais de cavalos. Além disso, o tamanho dos equinos também fornece os seguintes benefícios experimentais: (1) múltiplas feridas induzidas experimentalmente podem ser geradas em um local em um permitindo que controles e tratamentos sejam realizados no mesmo indivíduo, e (2) múltiplas amostras de feridas

podem ser coletadas ao longo do processo cicatricial permitindo uma avaliação mais completa, o que não pode ser realizado em humanos ou animais de pequeno porte. Ainda, os estudos em cavalos têm o potencial para beneficiar tanto a medicina veterinária como a medicina humana.

[004] Os transtornos fibroproliferativos, caracterizados pela deposição de Matriz Extra Celular (ECM) excessiva ou tecido de granulação, estão associados a inflamação crônica, proliferação celular e, sob algumas condições, falha no fechamento da ferida. O tecido fibroproliferativo se desenvolve exclusivamente em humanos, como cicatrizes hipertróficas e queloides, e nos membros distais de cavalos, chamado de tecido de granulação exuberante (TGE). Queloides geralmente desenvolvem após a reepitelização, enquanto o TGE é caracterizado pela reepitelização retardada.

[005] A apresentação clínica do TGE é notavelmente similar à do queleide humano, porém mais exacerbada. Essas condições compartilham uma série de características fisiopatológicas e histopatológicas. Em particular, inflamação crônica, angiogênese aberrante e epitelização e contração defeituosas.

[006] Os corticoides são fármacos com indicação terapêutica anti-inflamatória devido aos seus potentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. São capazes de bloquear desde as manifestações iniciais do processo inflamatório, como dor, calor e rubor, até as mais tardias como reparação e proliferação tecidual. Os esteroides anti-inflamatórios atingem todos os tipos de reação inflamatória, sejam elas causadas por patógenos invasores, estímulo físico ou químico, ou reação imunológica como as de hipersensibilidade e doenças autoimunes.

[007] Segundo alguns estudos na literatura, os glicocorticoides nem sempre apresentam indicações precisas, porém, constituem-se um grupo de fármacos muito usados na clínica médica. Possuem um amplo espectro de atividades e são considerados alguns dos anti-inflamatórios mais potentes, usado praticamente em todas as especialidades.

[008] A triancinolona é um importante corticosteroide fluoretado sintético, cuja atividade glicocorticoide é intensa e a atividade mineralocorticoide diminuída. Possui

potente efeito no processo inflamatório, por inibir a liberação do ácido araquidônico, suprimir a atividade dos fibroblastos e formar granulomas, estabilizando os lisossomos no tecido lesado, impedindo que as enzimas proteolíticas destes escapem e lesem as células vizinhas. A triancinolona é rotineiramente usada no tratamento das complicações cicatriciais em humanos, os queloides e na medicina equina, no TGE.

[009] A triancinolona é rotineiramente utilizada topicamente no controle da formação precoce de TGE em feridas de membros distais de cavalos que cicatrizam por segunda intenção. Comercialmente é encontrada em apresentação em creme ou pomada, associada à antifúngicos e antibióticos. Apesar de apresentar resultados satisfatórios na prevenção e controle do TGE, o uso de corticoide deve ser exclusivo na fase de exacerbada proliferação tecidual, não sendo aconselhável o seu uso durante todas as fases do processo cicatricial.

[010] A celulose bacteriana (CB) consiste em um biopolímero natural, sintetizado por bactérias composta em grande parte de água (98-99%) apresentando propriedades únicas como alta adsorção de líquidos, elevada pureza química, biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada resistência mecânica além de poder ser esterilizada sem ocorrer qualquer alteração em sua estrutura e propriedades.

[011] A CB apresenta elevada pureza e tem despertado interesse em várias áreas do conhecimento, entre elas na medicina, pois a estrutura da CB é uma matriz viável para auxiliar o tratamento de lesões dérmicas e vem sendo utilizada como substituto temporário de pele, queimaduras, úlceras, enxertos, como cobertura de ferimentos e para auxiliar em abrasões dérmicas.

[012] No tratamento de feridas, entre outros compostos, a CB ou Biocelulose tem se destacado pelas propriedades de biocompatibilidade, maleabilidade, elasticidade, transparência, capacidade de manter o ambiente da ferida úmido e absorver os exsudatos inflamatórios. A CB tem sido intensamente estudada e avaliada como material de reparação do tecido e diferentes variações da CB tem sido aplicada com sucesso na cicatrização da pele comprovando sua qualidade.

[013] Devido a sua estrutura altamente porosa e hidratada, a membrana de biocelulose pode ser usada como matriz ideal para incorporação de compostos orgânicos e inorgânicos, afim de se obter membranas compósitas multifuncionais.

ESTADO DA TÉCNICA

[014] A anterioridade BR102019027533-2 A2 depositada em 20/12/2019 sob o título “CURATIVOS ANTIMICROBIANOS DE CELULOSE BACTERIANA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS E QUEIMADURAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E PRODUTOS OBTIDOS” refere-se a curativos constituídos de membranas de celulose bacteriana contendo nanopartículas de prata (NPAg), a serem empregados no tratamento de feridas crônicas, obtidos a partir da imersão das membranas de CB porosas em diluições sucessivas de NPAg, com concentração entre 62,5 e 500 ppm e seu processo de obtenção. Embora a anterioridade apresente a utilização da membrana de celulose bacteriana no tratamento de feridas, a mesma utiliza-se de nanopartículas de prata como agente microbiano, sendo diferente da finalidade desta novidade inventiva.

[015] A anterioridade CN112553883A depositada em 25/09/2019 sob o título “BIOLOGICAL CELLULOSE FIBER, HEMOSTATIC DRESSING CONTAINING BIOLOGICAL CELLULOSE FIBER AND RELATED APPLICATION” retrata o uso de uma membrana de biocelulose associada a quitosana que pode ser usada para fazer um curativo hemostático com hemostasia rápida e boas propriedades mecânicas. Ao se referir ao atual invento, o mesmo difere por não se tratar de um compósito polimérico.

[016] A anterioridade BR 10 2019 016368 2 A2 depositada em 07/08/2019 sob o título “PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE FILMES DE CELULOSE BACTERIANA COMPATÍVEIS COM FIBROBLASTOS E COM SUPERFÍCIE QUIMICAMENTE MODIFICADA COM MANOSILADOS, SUCCINILADOS E COLÁGENO, PRODUTOS OBTIDOS E SUA APLICAÇÃO COMO CICATRIZANTE” retrata a preparação de filmes de celulose bacteriana com superfície quimicamente modificada com monoésteres succínicos, N-arilmanosídeos monoésteres do ácido succínico e

colágeno, caracterizados por serem biomateriais com baixa toxicidade e com capacidade aumentada de indução de proliferação de células de tecido conjuntivo, o que possibilita sua aplicação em lesões cutâneas para melhorar o processo de cicatrização. O processo de modificação química da celulose bacteriana e os compostos utilizados, nesta anterioridade os torna diferente da novidade inventiva proposta.

[017] A anterioridade WO2020220300A1 depositada em 30/04/2019 sob o título “BIOCELLULOSE FIBER, HEMOSTATIC DRESSING COMPRISING SAID FIBER AND RELATED APPLICATION”. Refere-se à técnica de obtenção de um tipo de fibra de biocelulose, um curativo hemostático contendo a fibra e aplicações relacionadas, e em particular a um tipo de fibra de biocelulose, o curativo hemostático preparado. Embora a aplicação de tal anterioridade seja direcionado ao tratamento de feridas, tal anterioridade se direciona ao processo de obtenção das fibras de celulose bacteriana para a produção de um curativo homeostático.

[018] A anterioridade BR102017020466-9 A2 depositada em 25/09/2017 sob o título “BIOCURATIVO DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE CURCUMA LONGA PARA APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS EM INDIVÍDUOS COM: AUTISMO, CÂNCER, DOENÇAS NEGLIGENCIADAS E PSORÍASE” detalha o uso de membranas antimicrobianas e cicatrizantes de celulose bacteriana tendo como substância ativa o extrato de Cúrcuma Longa, substância esta que difere da atual novidade inventiva que utiliza corticoide como insumo farmacêutico.

[019] A anterioridade BR102013031073-5 B1 depositada em 03/12/2013 sob o título “PROCESSO DE OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA EM BICAMADA COMO BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS E SUPORTE PARA CRESCIMENTO CELULAR”. Descreve um processo de produção de membranas de celulose bacteriana em cinco etapas, onde o meio de cultivo utiliza melaço de cana de açúcar e etanol como fontes de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, definidos qualitativamente e quantitativamente; com o processo se obtém uma membrana de celulose bacteriana dupla camada, com as características

estruturais e funcionais que permitem a liberação sustentada de fármacos e outros produtos biologicamente ativos; a membrana de celulose dupla camada permite a utilização como suporte para crescimento de células para aplicação em engenharia de tecidos, bem como sua utilização como substituto temporário de pele e liberação de fatores de crescimento residual. Embora se tratar do desenvolvimento de membranas de dupla camada, tal anterioridade refere-se à produção de uma membrana direcionada a liberação farmacêutica, contudo, não deixa específico o uso pontual de algum insumo ou fármaco específico, sendo direcionado principalmente à obtenção de uma membrana dupla. A atual novidade inventiva se direciona ao uso de corticoides associados a membranas de celulose, sendo divergente de tal anterioridade.

[020] A anterioridade CN104487102A depositada em 21/05/2012 sob o título “WOUND DRESSING COMPRISING BIO-CELLULOSE AND SILVER NANOPARTICLES” refere a curativos para feridas, métodos de preparação dos mesmos e métodos de uso dos mesmos. Além disso, divulga um curativo que compreende: biocelulose; e nanopartículas de prata, em que a concentração de nanopartículas de prata é de cerca de $1000\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ ou menos ou cerca de $1000\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ou menos, e em que as nanopartículas de prata têm um máximo de ressonância de plasma de superfície localizada de cerca de 600nm a cerca de 800nm.

[021] A anterioridade PI 1100760-5 B1 depositada em 07/01/2011 sob o título “BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA OBTIDO A PARTIR DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE PRÓPOLIS, BEM COMO SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS” discorre sobre 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, anti-inflamatória, analgésica e anestésica, além de

oferecer reconstituição do material tissular (reepitelização), obtidos por um processo relativamente simples e de baixo custo para produção. Embora se tratar de um curativo que se utiliza da membrana de celulose bacteriana para a liberação de insumos farmacêuticos para a regeneração tecidual, tal invento difere da atual proposta em seus insumos de aplicação, sendo ainda considerado inovação quando comparado ao invento proposto.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[022] A presente invenção inovadora proposta consiste na confecção de um curativo de uso tópico com efeito sinérgico entre a membrana de biocelulose (matriz) e a triancinolona, resultando em um compósito não descrito até o momento na literatura científica e nem disponível no mercado. Para isso, faz-se necessária a preparação e caracterização físico-química de biocurativos de celulose bacteriana contendo o corticoide triancinolona como ativo principal, visando a liberação controlada do mesmo no tratamento de queloides e cicatrizes hipertróficas em humanos e animais.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE CONTENDO TRIANCINOLONA E FIGURAS

[023] A seguir, serão apresentadas as etapas de preparação dos biocurativos de biocelulose contendo triancinolona.

[024] A primeira etapa consiste na obtenção da celulose bacteriana: Esta etapa subdivide-se em 2 etapas: (a) a ativação do cultivo bacteriano em meio sólido e (b) o estabelecimento do meio de cultura líquido;

[025] A segunda etapa, que consiste na purificação da celulose bacteriana.

[026] Para a primeira etapa, obtenção da celulose bacteriana, a etapa (a) consiste em ativar o cultivo bacteriano em meio sólido. Para isso: (a) foi preparado um meio sólido contendo: 4g de glicose; 1g de extrato de levedura; 0,54g de Na₂HPO₄ (fosfato de sódio bibásico anidro); 0,23g de ácido cítrico monohidratado; 4g de ágar e 200ml de água destilada. Em seguida, todos os componentes foram autoclavados à 121° C por 20 minutos, e adicionados a placas de petri de 9cm de diâmetro. O estabelecimento da bactéria da espécie *Komagataeibacter rhaeticus* foi feito em

placas de petri com meio estéril preparado previamente e esterilizados com radiação ultra-violeta (UV) antes da semeadura. Após a semeadura, as placas foram armazenadas em BODs com temperatura de 28°C por 2 dias para posterior estabelecimento em meio líquido.

[027] A etapa (b) consiste no estabelecimento de meio de cultura líquido, em que o meio utilizado para a produção da CB foi o meio de cultivo HS (*Hestrin-Schramm*), sendo constituído por: 50g de glicose; 0,73g de MgSO₄ (sulfato de magnésio); 2g de KH₂PO₄ (fosfato de potássio monobásico); 4g de extrato levedura; 20 ml de EtOH 99,8% (álcool etílico) e 980ml de água destilada. Os componentes foram autoclavados à 121°C por 20 minutos e posteriormente foi adicionado o álcool etílico 99,8% ao fim do processo. Em seguida, a bactéria *Komagataeibacter rhaeticus* foi inoculada do meio de cultura sólido para o meio líquido com o auxílio de uma alça bacteriológica, em fluxo laminar previamente esterilizado. Posteriormente, o cultivo em estado líquido fora armazenado em estufa do tipo BOD sob 28°C por 4 dias. Após o quarto dia, fora realizado um repique utilizando 10ml do meio com a bactéria e adicionado a um novo meio de cultivo. Por fim, após uma semana as membranas obtidas na superfície do meio foram removidas do meio de cultura e então purificadas.

[028] A segunda etapa, consiste na purificação da celulose bacteriana, em que, após a obtenção das membranas de CB foi realizada a purificação da mesma, no intuito da remoção das células bacterianas e dos resíduos dos materiais utilizados. Para a purificação foi utilizado uma solução de 0,1 mol/L de NaOH (hidróxido de sódio) em água destilada. Posteriormente, as membranas foram imersas na solução de NaOH, e submetidas a banho termostático à 70°C por 40 minutos, com intervalos de agitação de 5 minutos. Ao fim do processo, as membranas purificadas foram lavadas em água destilada até a neutralização do pH. Durante a obtenção de CB observou-se que houve a produção da membrana de CB espessa, após os sete dias de cultivo depois do repique seguindo o modelo proposto. A Figura 1 apresenta o esquema de produção das membranas de CB, onde: em (a) compreende a ativação em meio de cultivo sólido; e em (b) o meio de

cultura líquido após o primeiro repique; e em (c) a purificação da membrana de CB.

[029] Com relação à caracterização da celulose bacteriana (CB), avaliou-se a espessura da CB, a qual foi realizada com o auxílio de um micrometro digital (*Mitutoyo Corporation*®), após o repique ao final do sétimo dia. Foram realizadas medições de diferentes partes da membrana, a fim de se verificar o crescimento da camada de celulose na superfície do meio de cultura estava uniforme.

[030] Foi realizada a avaliação da porcentagem da CB em relação à massa seca, utilizando-se um medidor de umidade 200 (*Marte*®), sob 110 °C a fim de se verificar a quantidade de água presente na membrana de CB em natura e após a secagem, verificando assim a porcentagem de volume de água presente na membrana de CB.

[031] Foi realizada a análise térmica por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial, em que as análises foram efetuadas utilizando equipamento modelo SDT Q600 (*TA Instruments*, USA) com taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio de temperatura ambiente até 800°C. Utilizando aproximadamente 3 mg de cada amostra, as amostras foram adicionadas inicialmente a um cadinho de alumina previamente a análise.

[032] Foi realizada a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde a morfologia da superfície das amostras foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JMF-6700F). Todas as amostras foram depositadas em suportes de cobre, recobertas por uma camada de carbono com espessura de 1-10nm, com microscópio operando na tensão de 2kV.

[033] Foi realizada a análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), onde os espectros de FTIR foram obtidos utilizando o espectrômetro *Carry 630 FTIR Agilent*, no Laboratório CBQuim, Universidade de Araraquara 12 (UNIARA), Araraquara, São Paulo. As análises foram realizadas nas membranas contendo o corticoide triancinolona (MCBT) e nas membranas sem a presença do mesmo (MCB), além disso as membranas com e sem o corticoide também foram analisadas após a secagem em estufa de circulação de ar (Quimis®180) à 50°C, por 12 horas (MCBTS e MCBS, respectivamente).

[034] Foi realizada a incorporação da triancinolona na membrana de CB, em que houve a incorporação do corticoide triancinolona, utilizando o método no qual a membrana de CB foi cortada em dimensões de 2cm x 2cm (4 cm²), e posteriormente prensada com a intenção de remover parte do volume de água existente na membrana. Em seguida foi incorporado o corticoide triancinolona em uma concentração de 400ug/ml, e deixada em repouso até total absorção do volume adicionado ao fim desse procedimento foi acondicionada à 8°C.

[035] Foi realizada a análise de Espectroscopia de varredura, em que foi utilizado para obtenção da curva de varredura o Espectrofotômetro LAMBDA 365 UV/Vis| *PerkinElmer*®, realizou-se a varredura das concentrações de 2ug/mL e 20 ug/mL no intervalo de 200nm a 500nm de comprimento de onda (λ).

[036] Foi realizado o desenvolvimento de curva analítica padrão, em que, para a construção da curva analítica padrão, foi preparada uma solução estoque com presença de 25% de EtOH e 75% de água destilada. Diferentes alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com água destilada q.s.p. a fim de obter soluções de diferentes concentrações (2ug/mL, 4ug/mL, 8ug/mL, 12ug/mL, 16ug/mL e 20ug/mL). As absorbâncias das soluções foram determinadas por espectrometria na região UV-Vis em 251nm, usando a mesma composição das amostras sem a presença do corticoide como branco. Para a plotagem dos dados foi utilizado o programa de estatística *Origin (Pro)*, 9.0. *OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA*.

[037] Foi realizado o ensaio de liberação *in vitro*, através de células de Franz (Figura 2), compostas basicamente de: compartimento dosador, onde o fármaco é depositado; compartimento receptor, solução na qual a droga ser difundida, e a membrana, que tem papel de barreira na absorção (FRANZ, 1975). Estas células, quando controlados os parâmetros (temperatura fisiológica do organismo) envolvidos nesta metodologia, como a natureza da membrana, temperatura, a dose e agitação, simulam ao máximo o fenômeno da passagem percutânea da droga *in vivo*. A liberação de triancinolona foi avaliada no equipamento manual de permeação cutânea

(*Hanson Microette HANSON 0700-1251*), contendo seis células de Franz, de volume aproximado de 11mL. A liberação do fármaco foi estudada utilizando a membrana deCB, com uma solução receptora composta por 46% de EtOH e 54% de água destilada. As membranas com concentração de 400ug/cm² foram acondicionadas sob a parte superior das células de Franz, além disso, os experimentos foram conduzidos a 36°C e a solução receptora foi mantida no interior das células, com objetivo de permanência de contato com a membrana de biocelulose, sendo mantido sob agitação. Alíquotas de 1mL foram coletadas nos tempos de 1; 2; 4; 6; 10; 12 e 24 horas, com reposição do volume coletado, para posterior leitura em equipamento UV/Vis.

[038] As análises quantitativas foram realizadas a 251nm a temperatura ambiente, utilizando cubeta de quartzo de 1cm de diâmetro em espectrofotômetro LAMBDA 365 UV / Vis| *PerkinElmer*®, localizado no laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat– Araraquara-SP).

[039] A Figura 3 refere-se ao gráfico obtido a partir das análises de TG/DSC, em que: a. Membrana de CB sem purificação, b. Membrana de CB purificada. Onde o gráfico vermelho representa o fluxo de calor; o verde representa a perda de massa e o gráfico azul representa a derivação da massa.

[040] Com relação à análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial, baseados nos resultados obtidos nas análises térmicas pode-se observar que a membrana de CB ainda sem a purificação (Figura 3.a.) apresenta pequenos eventos entre 150-200°C, e dois eventos de transição entre 340-360°C, diferentemente dos dados apresentados pela análise térmica da membrana após a purificação (Figura 3.b.). Provavelmente, os eventos intermediários apresentados pelos dados na membrana não purificada estão relacionados aos resíduos contidos na membrana após sua produção. Baseados nestes dados pode-se afirmar que a purificação é uma etapa de importância na produção de um material de melhor qualidade, no qual a ausência de resíduos auxiliaria na incorporação de insumos farmacêuticos, como visado na atual proposta.

[041] Com relação à obtenção da membrana de CB, durante a obtenção das membranas de celulose bacteriana, não foi observado qualquer tipo de desgaste, ocasionados por eventos externo ou internos ao ambiente de cultivo utilizado. Além disso, foi possível a obtenção das membranas a serem utilizadas nas etapas posteriores.

[042] Com relação à avaliação da espessura de membrana, os resultados obtidos através da medição com o micrômetro mostraram que após a purificação da membrana de celulose, a mesma possuía uma média de 5,45mm de espessura, o que indica que o crescimento foi efetivo sem nenhum agente contaminante, e seguindo as medidas das outras regiões da membrana houve um desvio médio de aproximadamente $\pm 0,24$ mm, sendo considerado um crescimento homogêneo. Para as medidas da membrana de celulose seca, foi apresentado uma média de aproximadamente 0,205mm com variação média de $\pm 0,0015$ mm. Dessa forma, nota-se a variação de espessura entre a membrana *in natura* e a membrana seca, podendo se considerar que a membrana possui um alto volume de água em sua composição, o qual pode se justificar a diferença de 5,24mm de entre a espessura da membrana de CB úmida, quando comparada a membrana seca.

[043] Com relação à avaliação de massa seca, para a avaliação da massa seca, os resultados obtidos mostraram que a massa inicial da membrana úmida foi de 10,26g, e após a secagem 0,17g. Com isso, os resultados mostram que os dados corroboram com os obtidos na medida da espessura, nos quais cerca de 98,34% da membrana de CB, é constituída basicamente por água. Onde, 1,66% da massa total da membrana seria relacionado à rede de fibras de celulose.

[044] Com relação à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Alta Resolução com Emissão por Campo, baseados nos resultados obtidos da microscopia eletrônica de varredura pode-se observar que não houveram modificações nas fibras de CB, as quais apresentaram uma distribuição em formas de rede, além de apresentar homogeneidade em sua distribuição (Figura 4). Além disso, pode se observar que o tamanho da espessura das fibras de celulose bactérias são de aproximadamente 1 μ m. Outro ponto observado que a mesma membrana

apresenta porosidade na qual seria possível a incorporação de derivados farmacêuticos, uma vez que a membrana seca possui um elevado grau de absorção. A Figura 4 apresenta a Micrografia Eletrônica de Varredura das membranas de CB após a purificação; a. Ampliação de 10.000x; b. Ampliação de 25.000x; c. Ampliação de 50.000x.

[045] Em relação à incorporação de triancinolona na membrana de CB, para a incorporação da triancinolona foram observados que após a metodologia proposta (Figura 5), houve a absorção de 1,7mL, sendo a absorção após 4 horas, de 85% do volume total adicionado. A Figura 5 apresenta o esquema de incorporação da triancinolona na membrana de CB; a. Membrana de CB após a purificação; b. Membrana de CB pura cortada em 3cmX3cm; c. Processo de prensagem da membrana para remoção do excesso de água; d. Membrana de CB, após o processo de remoção de água; e. incorporação de triancinolona.

[046] Em relação à análise por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), de acordo com o espectro de infravermelho obtido (Figura 6), pode-se observar as caracterizações de cada membrana. A Figura 6 apresenta o espectro de FTIR das membranas de CB, onde MCBT. Membrana de celulose bacteriana com triancinolona; MCBTS. Membrana de celulose bacteriana seca com triancinolona; MCB. Membrana de celulose bacteriana; MCBS. Membrana de celulose bacteriana seca. Ao se observar os dados, nota-se uma grande banda na região entre $3000-3600\text{ cm}^{-1}$ para as membranas úmidas, segundo dados na literatura, a região entre $3350-3500\text{ cm}^{-1}$ relaciona-se a região de estiramento O-H, provavelmente tais bandas estão atribuídas pela presença de água nas membranas, pois quando avalia-se mesma região para as membranas secas podemos notar que tal banda não aparece com mesma intensidade. Além disso, no intervalo de $1035-1060\text{ cm}^{-1}$, se relaciona ao estiramento de C-O (SHIN *et al.*, 2000). Contudo, ao relacionar a triancinolona, os dados obtidos ainda são inconclusivos, pois segundo o estudo de Shin *et al* (2000), a triancinolona apresenta seus picos característicos nas regiões de 3000 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} , o

que poderia resultar em uma sobreposição de picos com a da CB, impossibilitando assim sua identificação.

[047] Em relação à análise por Espectroscopia de Varredura Os dados obtidos do espectrofotômetro LAMBDA 365 UV/Vis *PerkinElmer*® foram plotados obtendo-se o seguinte gráfico (Figura 7). A Figura 7 refere-se à curva de varredura da Triancinolona, onde a curva verde representa a concentração de 1,25ug/mL e a curva vermelha representa a concentração de 20 ug/mL. Ao analisar-se a concentração de 1,25ug/mL nota-se que o limite de detecção mínimo não foi o suficiente para encontrarmos a análise da amostra de triancinolona. Entretanto ao observarmos a concentração de 20ug/mL, pode-se constatar que houveram a presença de dois picos de absorbância. Segundo dados citados por Aquino (2011), o comprimento de onda correspondente à triancinolona situa-se na faixa entre de 250nm. Dessa forma, constatou-se que o valor de comprimento de onda de 251nm seria referente a triancinolona presente na amostra, dessa maneira tal comprimento foi utilizado para as posteriores análises.

[048] Em relação ao desenvolvimento de curva analítica padrão, os dados obtidos por espectroscopia foram utilizados para construir a curva analítica (Figura 8), em que a reta vermelha representa o ajuste linear e B representa a absorbância da amostra. Onde, $a = 0,05149$; $b = 0,01399$ e r^2 . A curva padrão apresentou linearidade segundo o valor estatístico do R de Pearson ($r^2 = 0,996$) no intervalo das concentrações da faixa de 2 a 20µg/ml, o qual corresponde ao coeficiente de correlação, o mesmo pode variar em termos de valor de -1 a +1, quanto maior for o valor absoluto do coeficiente, mais forte é a relação entre as variáveis (FILHO, 2009), tendo como equação linear da reta expressa na Equação 1 (equação linear obtida a partir da linearidade da curva de calibração de triancinolona).

$$y = 0,05179 + 0.01399x$$

Equação 1

[049] Para a correlação de Pearson, um valor absoluto de 1 indica uma relação linear perfeita. A correlação perto de 0 indica que não há relação linear entre as variáveis (FILHO, 2009). O resultado obtido foi satisfatório para o experimento realizado, indicando que houve linearidade estatística.

[050] Em relação ao ensaio de liberação *in vitro*, a Figura 9 (perfil de liberação do fármaco triancinolona em um período de 24h) demonstra o perfil de liberação do fármaco, constatando a liberação por um determinado período. A solubilidade demonstrada no meio receptor foi de 0,6mg/mL, comprovando a presença na condição *Sink* do fármaco, que é definida como: o volume de meio, pelos menos, três vezes maior do que o necessário para obter uma solução saturada do fármaco, de modo que o gradiente de concentração seja mantido, não interferindo na velocidade de dissolução (EMMANUEL, 2010). O meio de dissolução deve ser desareado antes do início da análise para evitar a formação de bolhas na superfície do compacto. A formação de bolhas pode gerar resultados equivocados, pois impede que o compacto entre em contato com o meio dificultando a dissolução (ROSA, 2012). A análise de Espectrofotometria UVVis foi realizada posteriormente às coletas, tendo como resultados os valores representados pela Figura 9. Pode-se observar que, na primeira hora, a qual é representada pelo primeiro ponto, houve um aumento gradativo da liberação do corticoide triancinolona. Após 2 horas, houve um aumento, como esperado o qual prosseguiu até o período de 6 horas, posteriormente, observa-se um platô na liberação, mais especificamente a partir de 5 horas. A liberação total do fármaco ao final do período foi de aproximadamente 14% indicando liberação farmacêutica prolongada. Segundo Klemm e colaboradores (2018). A membrana é capaz de controlar a liberação da triancinolona, por possuir a capacidade de formar filmes macios, flexíveis e dobráveis, e também, devido à sua nanoestrutura tridimensional única, e é capaz de conter elevadas quantidades de substâncias ativas. Conclui-se que a liberação *in vitro*, onde a membrana de biocelulose contém o corticoide triancinolona, possui eficiência no que diz respeito ao fármaco introduzido, devido à estrutura de rede da biocelulose, demonstrada na Micrografia Eletrônica de Varredura MEV, onde não houveram modificações nas fibras, portanto, a mesma possui capacidade de absorção do fármaco utilizado, constatamos seu desempenho adequado no que diz respeito à liberação, pois de acordo com os resultados, ocorre a liberação prolongada e controlada do corticoide adicionado na membrana de biocelulose.

[051] Em relação ao CASO CLÍNICO, foi encaminhado ao Hospital Veterinário um equino, fêmea, SRD, com 10 anos de idade, com prenhez de 7 meses, apresentando ferida crônica no metatarso decorrente de trauma em arame liso. O histórico fornecido pelo proprietário relatava evolução de quatro meses e tratamento tópico diário com solução de iodopovidine tópico e spray repelente, com resultados não satisfatórios e formação de tecido de granulação exuberante. Ao exame clínico observou-se ferida na porção plantar do metatarso direito medindo 14 x 8cm, apresentando tecido de granulação de 3 cm acima do nível da pele, coloração rósea claro e presença de secreção amarelada (Figura 10), onde em (A) Vista posterior e em (B) Vista lateral.

[052] Por estar gestante, a exérese cirúrgica do TGE foi descartada por envolver contenção química do animal e colocação de torniquete proximal ao local da exérese prevenindo hemorragia durante o procedimento. Sendo assim, foi realizado o teste com a membrana de biocelulose contendo triancinolona, desenvolvida em parceria com a Uniara e BioSmart. A membrana foi colocada sobre o leito da ferida e ato contínuo foi colocada uma atadura compressiva para garantir que a membrana ficasse aderida à ferida. Após três dias a atadura foi removida com observação de redução significativa do TGE (Figura 11, ferida após a remoção da atadura aos 3 dias após a colocação da membrana embebida com triancinolona). Como a membrana foi removida juntamente com a atadura, optou-se colocar uma nova membrana e sobre ela a atadura compressiva. Os curativos foram realizados a cada três dias. Foram utilizadas 4 membranas durante o tratamento num intervalo de 12 dias. Quando se observou a ausência de TGE (Figura 12: Aos 15 dias após início do tratamento. Nota-se a presença da membrana aderida à ferida e a borda da ferida no mesmo nível da pele íntegra), a colocação da membrana foi descontinuada e se iniciou os curativos de rotina de feridas em equinos. Neste caso foram utilizados alternadamente o óleo de girassol e o iodo povidine tópico, mantendo a ferida sempre recoberta com atadura compressiva. A égua teve alta hospitalar com completa cicatrização da ferida.

[053] Baseados nos dados encontrados, conclui-se que a membrana de celulose bacteriana é promissora para a incorporação farmacêutica, uma vez que a mesma possui elevado grau de pureza, elevada estabilidade térmica.

[054] Além de possuir uma estrutura tridimensional em rede pela qual favorece a proteção contra particulados e agentes infecciosos, e facilita a troca gasosa no ambiente do ferimento, além de permitir a incorporação farmacêutica. Outro ponto relevante é sua capacidade de liberação controlada que foi demonstrado que em 24 horas somente 14% do fármaco total incorporado foi liberado. No caso concluímos que a membrana de biocelulose contendo triancinolona reduziu significativamente o TGE, sem causar nenhum desconforto ou alteração clínica no animal, substituindo a exérese cirúrgica e auxiliando a cicatrização da ferida.

REIVINDICAÇÕES

1) PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE CONTENDO TRIANCINOLONA, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

1- Primeira etapa, em que consiste na obtenção da celulose bacteriana, em que esta etapa se subdivide em 2 etapas:

- (a) a ativação do cultivo bacteriano em meio sólido e (b) o estabelecimento do meio de cultura líquido; a etapa (a) consiste em ativar o cultivo bacteriano em meio sólido e, para isso, foi preparado um meio sólido contendo: 4g de glicose; 1g de extrato de levedura; 0,54g de Na_2HPO_4 (fosfato de sódio bibásico anidro); 0,23g de ácido cítrico monohidratado; 4g de ágar e 200ml de água destilada; em que em seguida, todos os componentes foram autoclavados à 121° C por 20 minutos, e adicionados a placas de petri de 9cm de diâmetro; em que o estabelecimento da bactéria da espécie *Komagataeibacter rhaeticus* foi feito em placas de petri com meio estéril preparado previamente e esterilizados com radiação ultra-violeta (UV) antes da semeadura; em que após a semeadura, as placas foram armazenadas em BODs com temperatura de 28°C por 2 dias para posterior estabelecimento em meio líquido;

- em que a etapa (b) consiste no estabelecimento de meio de cultura líquido, em que o meio utilizado para a produção da CB foi o meio de cultivo HS (*Hestrin-Schramm*), sendo constituído por: 50g de glicose; 0,73g de MgSO_4 (sulfato de magnésio); 2g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico); 4g de extrato levedura; 20 ml de EtOH 99,8% (álcool etílico) e 980ml de água destilada; em que os componentes foram autoclavados à 121°C por 20 minutos e posteriormente foi adicionado o álcool etílico 99,8% ao fim do processo; em que em seguida, a bactéria *Komagataeibacter rhaeticus* foi inoculada do meio de cultura sólido para o meio líquido com o auxílio de uma alça bacteriológica, em fluxo laminar previamente esterilizado; em que posteriormente, o cultivo em estado líquido fora armazenado em estufa do tipo BOD sob 28°C por 4 dias; em que após o quarto dia, fora realizado um repique utilizando 10ml do meio com a bactéria e adicionado a um novo meio de cultivo; em que, após uma

semana as membranas obtidas na superfície do meio foram removidas do meio de cultura e então purificadas;

2- Segunda etapa que consiste na purificação da celulose bacteriana, em que, após a obtenção das membranas de CB foi realizada a purificação da mesma, no intuito da remoção das células bacterianas e dos resíduos dos materiais utilizados; em que para a purificação foi utilizado uma solução de 0,1 mol/L de NaOH (hidróxido de sódio) em água destilada; em que posteriormente, as membranas foram imersas na solução de NaOH, e submetidas a banho termostático à 70°C por 40 minutos, com intervalos de agitação de 5 minutos; em que ao fim do processo, as membranas purificadas foram lavadas em água destilada até a neutralização do pH; em que durante a obtenção de CB observou-se que houve a produção da membrana de CB espessa, após os sete dias de cultivo depois do repique seguindo o modelo proposto.

2) BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE CONTENDO TRIANCINOLONA, de acordo com o processo da reivindicação 1, **caracterizado por** ser composto de biocelulose contendo triancinolona.

3) USO DOS BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE CONTENDO TRIANCINOLONA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ser utilizado como curativo para aplicação médica e veterinária.

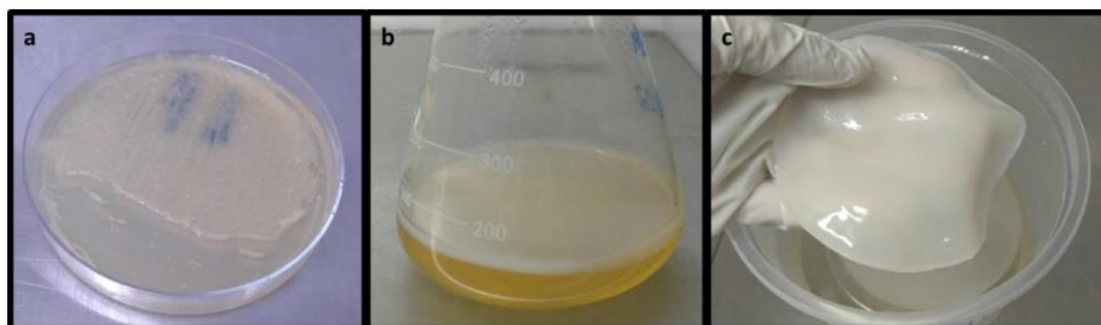


FIGURA 1



FIGURA 2

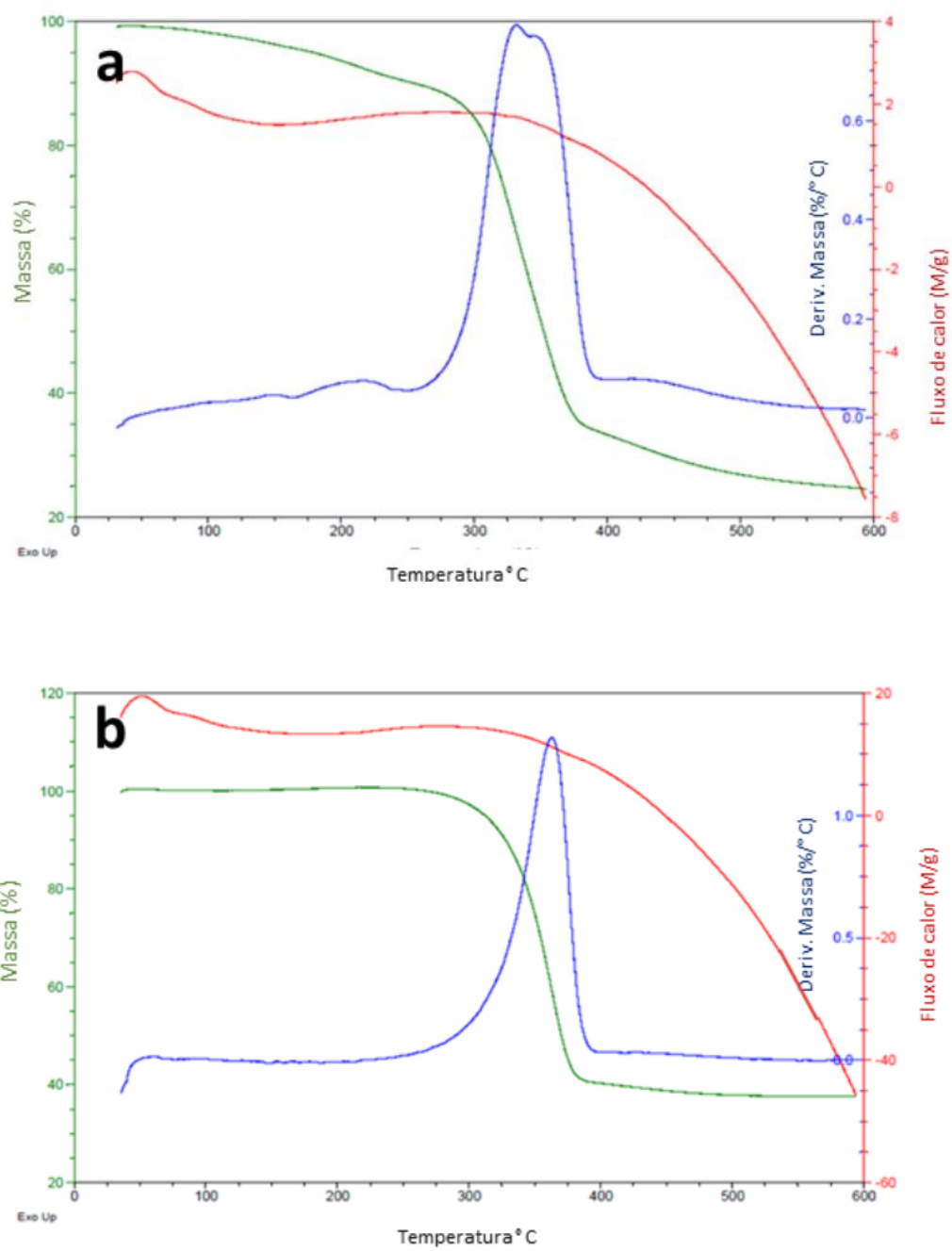


FIGURA 3

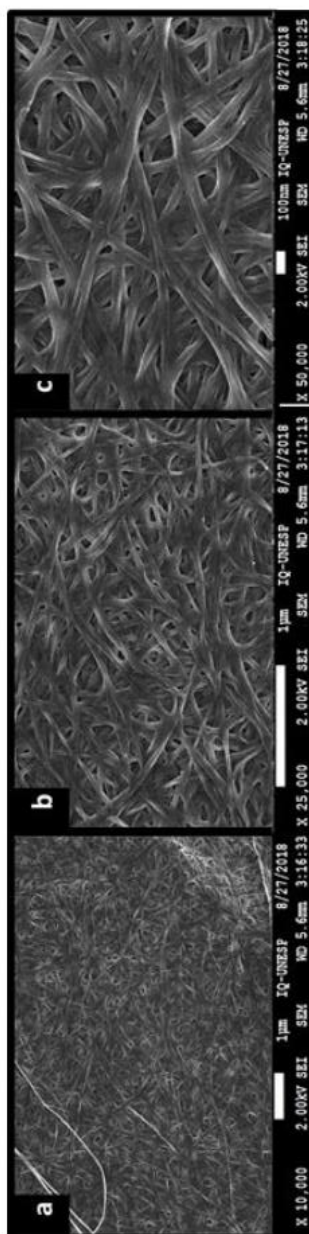
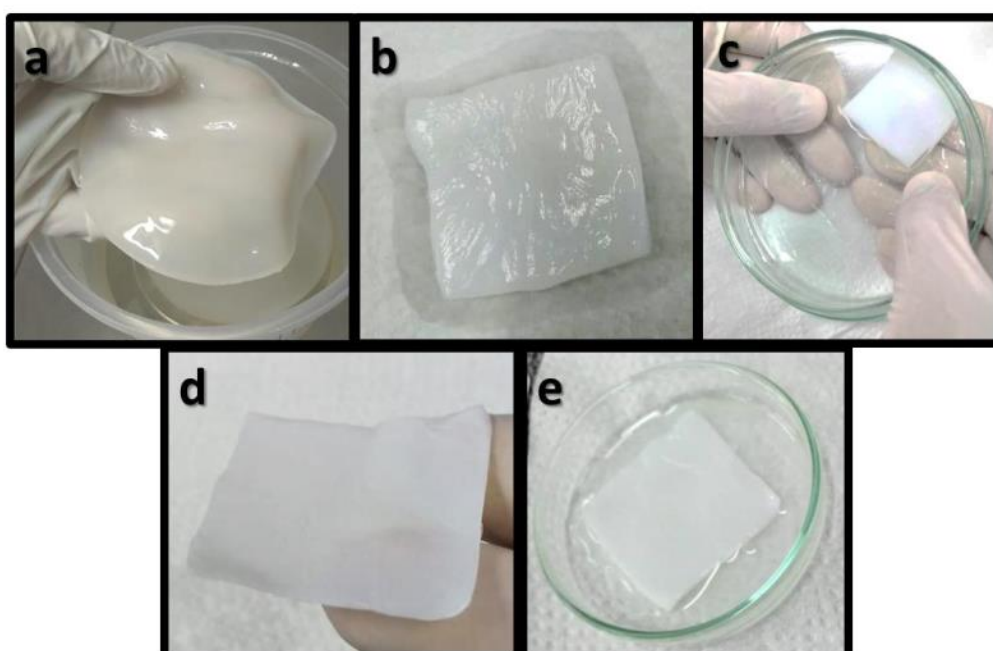
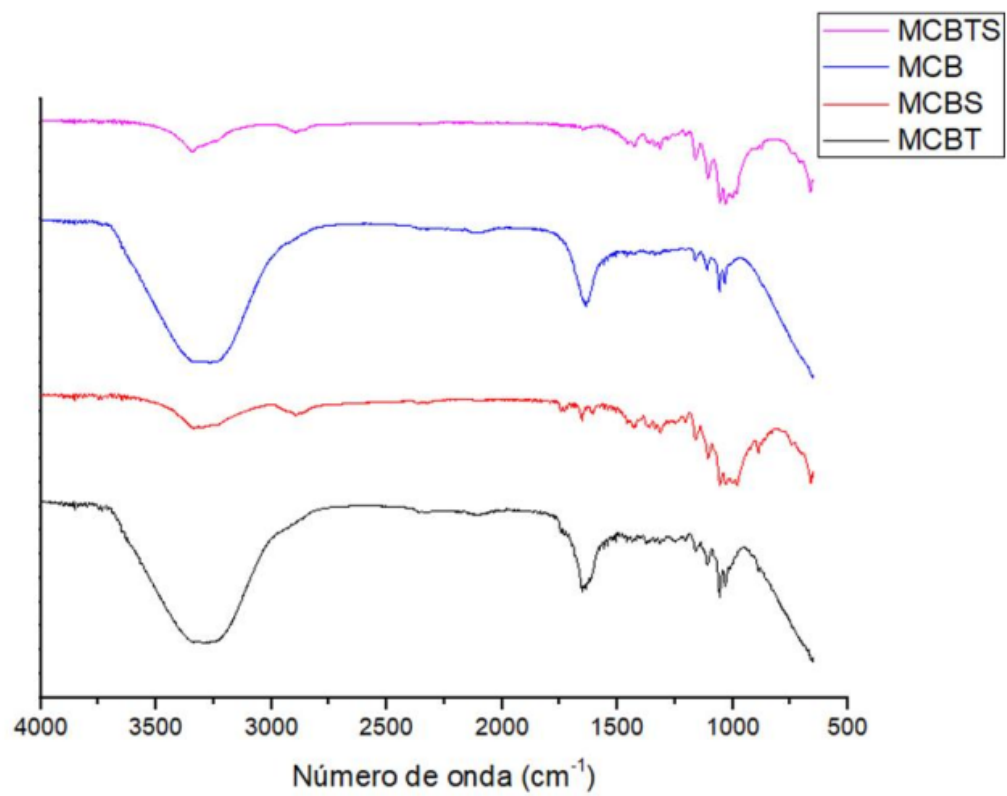


FIGURA 4

**FIGURA 5**

**FIGURA 6**

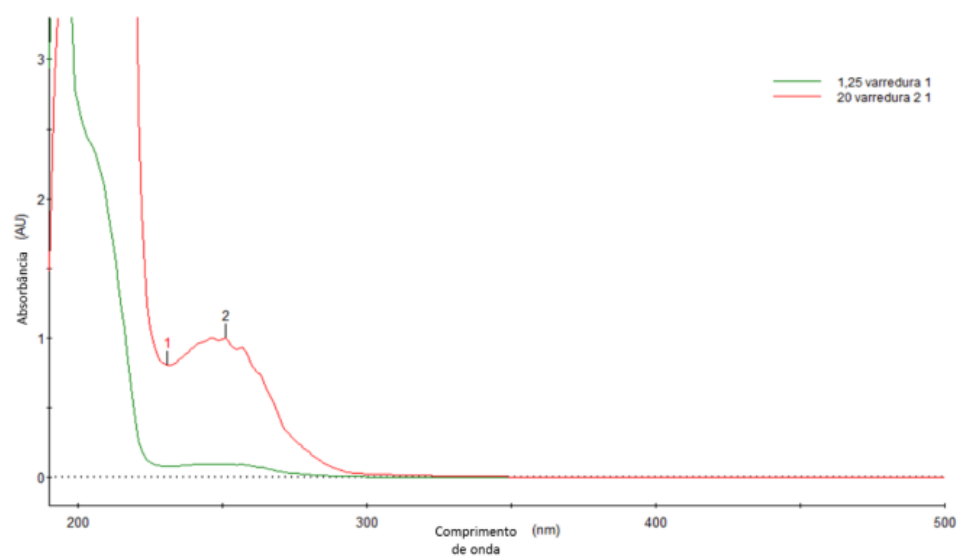


FIGURA 7

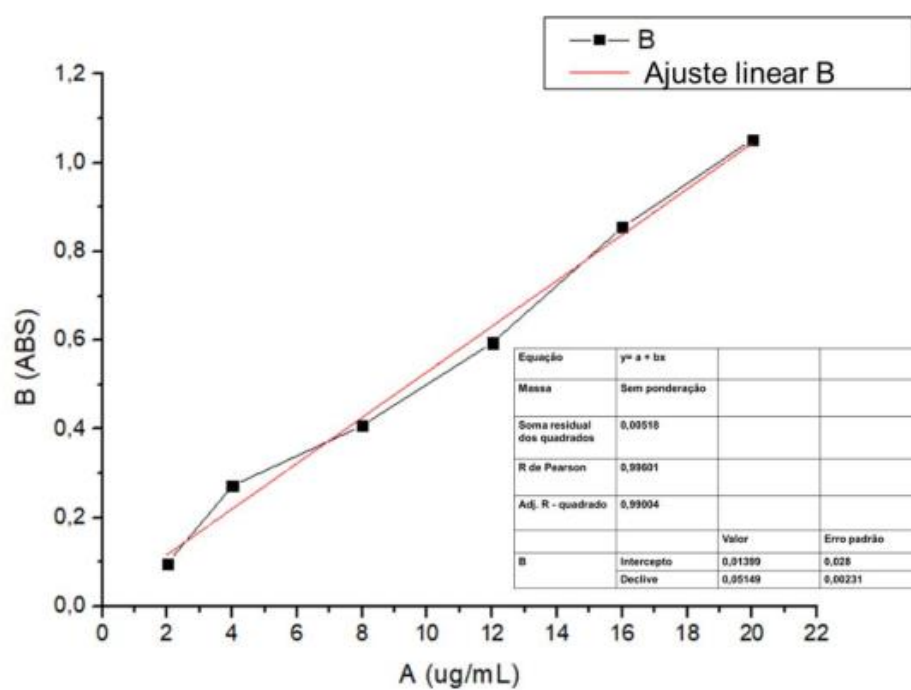
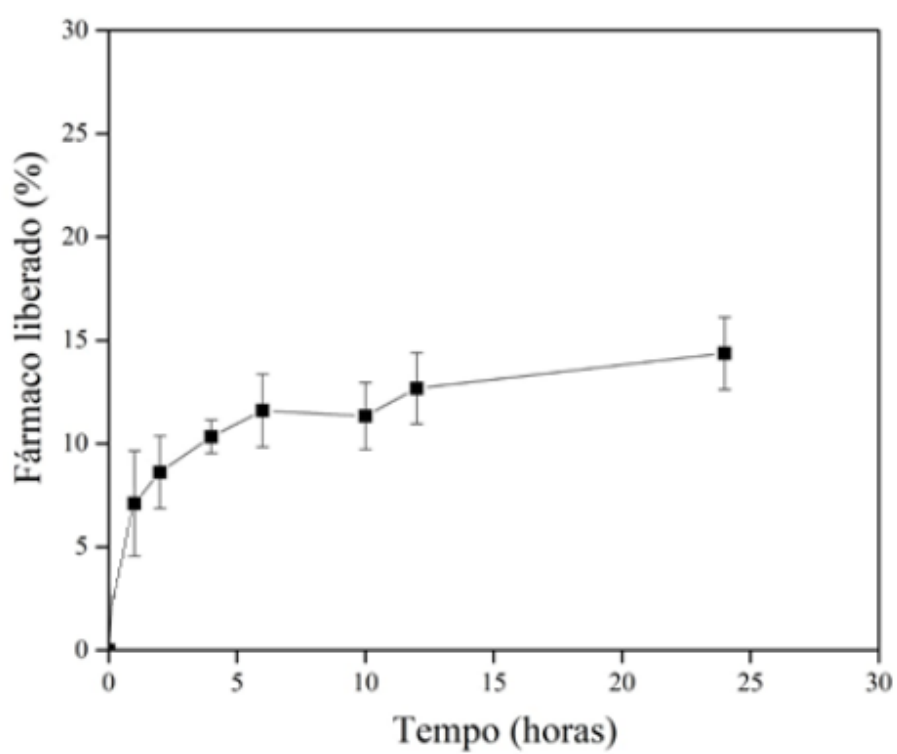


FIGURA 8

**FIGURA 9**

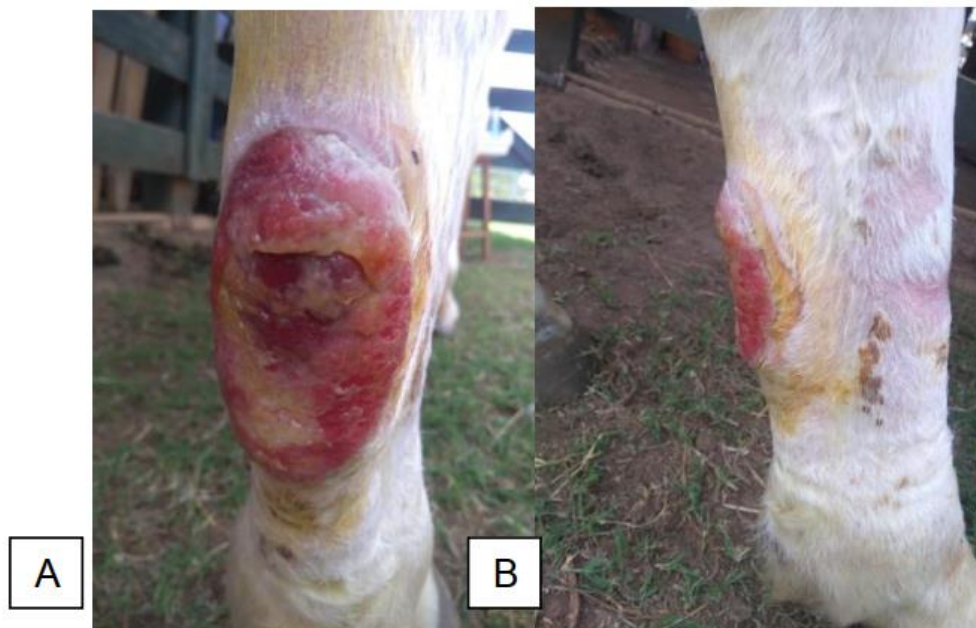


FIGURA 10



FIGURA 11



FIGURA 12

RESUMO

PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE BIOCURATIVOS DE BIOCELULOSE CONTENDO TRIANCINOLONA, BIOCURATIVOS E USO PARA APLICAÇÃO MÉDICA E VETERINÁRIA.

O presente pedido de patente compreende um biocurativo de biocelulose contendo triancinolona e o uso do biocurativo para aplicação médica e veterinária. A presente invenção pertence ao campo de tratamento de feridas, particularmente na área médica veterinária direcionada ao tratamento de lesões cutâneas em animais. Refere-se à utilização de curativos de celulose bacteriana aplicados sobre lesões de animais ocasionadas pela perda de tecido cutâneo, o qual há a necessidade de tratamento preventivo prévio ao agravamento do quadro clínico do animal doente.