REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

MINISTÉRIO DA ECONOMIA

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102015010848-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102015010848-6

(22) Data do Depósito: 12/05/2015

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 36/185; A61P 17/02.

(54) Título: FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO EXTRATO DE EMBAÚBA COM ATIVIDADE CICATRIZANTE

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 21195755000169. Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO S/N, SÃO PEDRO, JUIZ DE FORA, MG, BRASIL (BR), 36036-900; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 21949888000183. Endereço: RUA RAUL POMPÉIA, 101, SÃO PEDRO, BELO HORIZONTE, MG, BRASIL(BR), 30330-080

(72) Inventor: ELITA SCIO FONTES; DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO; ANA PAULA DO NASCIMENTO DUQUE; NÍCOLAS DE CASTRO CAMPOS PINTO; MARIA CHRISTINA MARQUES NOGUEIRA CASTANON.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 12/05/2015, observadas as condições legais

Expedida em: 12/01/2021

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO EXTRATO DE EMBAÚBA COM ATIVIDADE CICATRIZANTE

Setor técnico

[001] Trata-se a presente invenção de uma formulação líquida em gel de carbopol contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* a 2% e 5% e será explorada pela indústria farmacêutica.

Estado da Técnica

[002] São várias as enfermidades em que há um estado de necrose tecidual onde, apesar do processo de reparo desencadeado pelo organismo, as próprias condições locais impedem ou retardam o processo de recuperação do tecido. Esses quadros são manifestações secundárias comuns em várias doenças, entre elas o diabetes melito e a hipertensão venosa. Os portadores frequentemente desenvolvem graves sequelas, até mesmo sociais, como a perda de um membro e consequente afastamento do trabalho. Alguns estudos apontam que a cronificação de lesões é a segunda maior causa de absenteísmo no Brasil. Nota-se, portanto a necessidade de persistir nas pesquisas por novas formas de tratamento que favoreçam a cicatrização de feridas.

[003] As florestas brasileiras possuem alta diversidade de plantas medicinais, indicando um potencial considerável para estudos em farmacologia, toxicologia e química de novos fármacos. Entre elas se encontra a família URTICACEAE que é representada por cerca de 19 gêneros no Brasil, incluindo *Cecropia*, que possui mais de 50 espécies neste território, tendo extenso uso entre a população brasileira (ARAGÃO et al., 2010). Essas espécies estão largamente distribuídas na região Neotropical apresentando-se principalmente em clareiras e extensas áreas abertas, indicando a sua importância em estágios iniciais de processos sucessionais e em reflorestamentos heterogêneos de áreas

degradadas.

[004] Muitas das propostas de tratamento passam pelo uso de práticas terapêuticas naturais, inclusive com o uso de ervas medicinais. São muitos os fitoterápicos testados que apresentaram resultados significativos, entre eles as plantas do gênero *Cecropia* (NAYAK, 2006; NAYAK E ISITOR, 2008).

[005] A espécie *Cecropia pachystachya* Trécul é popularmente conhecida como embaúba, imbaúba, guarumo, guarumbo, umbaúba, umbaúba-do-brejo, árvore-da-preguiça, umbaubeira, pau-de-lixa, torem e umbaúba-branca. Suas folhas e casca são descritas etnobotanicamente com atividade anti-inflamatória, antitérmica, antitussígena, anti-asmática, anti-histamínica, anti-espasmódica, expectorante, hipoglicemiante, diurética, tônica, antihemorrágica, adstringente e hipotensora. Além dessas, há usos para o tratamento de infecções respiratórias, distúrbios cardiorenais e cardiopulmonares, tuberculose, lesões cutâneas, papilomas, hiperplasias epiteliais, herpes (NAYAK e ISITOR, 2008; SOUCCAR et al., 2008; STANGE et al., 2009; ARAGÃO et al., 2010; BIGLIANI et al., 2010; SILVA et al., 2010; UCHÔA et al., 2010; NICASIO-TORRES et al., 2012).

[006] Alguns estudos já confirmaram as atividades antioxidante (ARAGÃO et al., 2010), hipoglicemiante (NICASIO et al., 2005; ARAGÃO et al., 2010; NICASIO-TORRES, ERAZO-GOMEZ e CRUZ-SOSA, 2009; NICASIO-TORRES et al., 2012) hipolipemiante (NICASIO-TORRES et al., 2012) antimalárica (UCHÔA et al., 2010), hipotensora/antihipertensiva, broncodilatadora, ansiolítica, antidepressiva, antiácida e antiulcerogênica (SOUCCAR et al., 2008), cicatrizante (NAYAK, 2006; NAYAK e ISITOR, 2008) e antiherpética (SILVA et al., 2010); para várias espécies do gênero.

[007] Alguns métodos de detecção que compõem o estado da técnica podem ser encontrados nos artigos e documentos patentários descritos a seguir.

[008] O documento PI0401062-0 A descreve um complemento alimentar para auxiliar no tratamento e controle de vitiligo, sendo a fórmula constituída por 5 a 10% de *Cecropia peltata* ou *Cecropia palmata* entre outros componentes.

[009] Sartor et al. (2010) estudaram o extrato bruto de *Pereskia aculeata* em

feridas de ratos e observaram melhora significativa na proliferação vascular e fibroblástica e na reepitelização, bem como melhora clínica da ferida. Garros et al. (2006) observaram a ação do extrato de *Passiflora edulis* sobre lesões também em ratos, verificando aumento na proliferação fibroblástica e na colagenização. Já o estudo de Shimizu et al. (2009) mostrou uma boa ação cicatrizante do extrato de barbatimão (*Stryphnodendron poliphyllum*), auxiliando na reepitelização *in loco* e diminuindo a resposta inflamatória. Santos et al. (2006) realizaram estudos morfológicos e morfométricos concluindo que houve melhora histológica. Jorge et al. (2008) observaram a eficiência do extrato de *Arrabidaea chica* na estimulação do crescimento fibroblástico e na síntese de colágeno, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Outras espécies também apresentaram atividade cicatrizante significativa, a saber: *Alternanthera sessilis* (JALALPURE et al. 2008), *Morinda citrifolia* (NAYAK, SANDIFORD e MAXWELL, 2007), *Serratum lycopodium* (MANJUNATHA et al., 2007), *Sesamum indicum* (DHUMAL e KULKARNI, 2007), *Catharanthus roseus* (NAYAK, PEREIRA e LEXLEY, 2006), *Cecropia peltata* (NAYAK, 2006), *Euphorbia hirta* (JAIPRAKASH et al., 2006), *Ginkgo biloba* (BAIRY et al., 2006), *Pterocarpus santalinus* (MANJUNATHA, KUMAR e PATEL, 2005), *Lawsonia alba* (MANDAWADE e PATIL, 2003), *Napoleona imperialis* (ESIMONE, IBEZIM e CHAH, 2005), *Kaempferia galanga* (SHANBHAG et al., 2006), *Radix paeoniae* (MALVYIA, MALVYIA e JAIN, 2009) e *Foenum-graecum* (ISSARANI e NAGORI, 2004).

[010] As lesões cutâneas representam um grande problema para os pacientes e profissionais de saúde em todo o mundo. Elas não só afetam a saúde física e mental de milhões de pacientes, mas também impõem custos significativos. As estimativas atuais indicam que em todo o mundo cerca de 6 milhões de pessoas sofrem de feridas crônicas. Lesões cicatrizadas constantemente produzem mediadores inflamatórios que produzem dor e edema. Além disso, são um substrato para infecções, adiando a recuperação de pacientes. Feridas crônicas podem até mesmo conduzir a insuficiência múltipla de órgãos ou morte do paciente. Apesar da cicatrização ser um processo fisiológico, sua

história natural é muito complexa e ainda não está totalmente compreendida.

[011] O gênero *Cecropia* foi estudado pelo grupo de Nayak (2006) que verificou a ação cicatrizante da *Cecropia petalta* ao se observar redução significante da área da ferida e o aumento da quantidade de proteína, hidroxiprolina e hexosamina. Em outro estudo Nayak e Isitor (2008) estudaram a mesma espécie, observando também a redução da área da ferida, bem como uma rápida epitelização nos grupos tratados com *C.peltata*. Apesar do uso popular da espécie *C. pachystachya*, não existem estudos sobre a atividade cicatrizante.

Problemas técnicos existentes no estado da técnica

[012] O objetivo do tratamento de feridas é o reparo no menor tempo possível, com o mínimo de dor, desconforto e cicatrizes para o paciente. Espera-se que um agente terapêutico selecionado para o tratamento de feridas possa melhorar uma ou mais fases de cura sem produzir efeitos secundários nocivos.

[013] As lesões cutâneas representam um grande problema para os pacientes e profissionais de saúde. As estimativas atuais indicam que cerca de 6 milhões de pessoas no mundo sofrem de feridas crônicas (KUMAR et al., 2006). Essas lesões produzem dor, edema e infecções, as quais podem conduzir a insuficiência múltipla de órgãos ou morte do paciente (ROBERTS et al., 1998).

[014] A reparação tecidual é um processo biológico natural, porém tal fenômeno pode ser deficiente em pessoas idosas, imunocomprometidas ou com diabetes; em casos de isquemia, uso de alguns medicamentos, dieta inapropriada ou presença de feridas infeccionadas (NAGORI e SOLANKI, 2011), levando assim ao desenvolvimento de uma ferida crônica. A cicatrização prolongada ou incompleta é então um sério problema (INGOLD, 1993) sendo, então, importante favorecer condições por meio de terapia tópica para viabilizar o processo fisiológico.

[015] Ao longo dos séculos, procurou-se verificar a ação de substâncias químicas e/ou de procedimentos que pudessem agilizar o processo, quer na

ferida limpa, quer na contaminada ou infectada. Contudo, alguns deles mostraram-se ineficientes ou inibitórios do processo de resolução (AMORIM et al., 2006).

[016] Dessa forma, esforços estão sendo realizados com o intuito de se descobrir agentes que possam promover o reparo tecidual e, assim, reduzir o custo de hospitalização, evitar ou diminuir o risco de amputação e outras complicações graves. Embora a utilização de substâncias tópicas com intuito de melhorar a cicatrização vir sendo amplamente estudada (LEITE et al., 2002;GARROS et al., 2006; NITZ et al., 2006; SANTOS et al., 2006; JORGE et al., 2008; SHIMIZU et al., 2009; SARTOR et al., 2010; LODHI e SINGHAI, 2011; CESCA et al., 2012; LI et al., 2012; MURTI e KUMAR, 2012; NAGAPPAN et al., 2012; SURIYAMOORTHY, SUBRAMANIAM e WAHAB, 2012), apenas 1% a 3% dos fármacos listados nas farmacopeias ocidentais se destinam a serem utilizados para esse fim (NAGAPPAN et al., 2012).

[017] O tratamento de feridas objetiva o rápido fechamento das mesmas e formação de uma cicatriz esteticamente satisfatória. Para isso, são utilizados vários tipos de curativos e de produtos tópicos. Todavia, apesar dos avanços na compreensão do processo de cicatrização e do investimento em pesquisas para o desenvolvimento de recursos e tecnologias para favorecê-lo, a incidência de úlceras crônicas cutâneas permanece extremamente alta.

[018] Apesar de vários estudos envolverem a avaliação cicatrizante de extratos e produtos de origem animal, muitos pontos ainda podem ser destacados como falhas na elucidação, principalmente, do principal mecanismo de ação desses novos produtos. Garros et al. (2006), por exemplo, ao observar a ação do extrato de *Passiflora edulis* sobre lesões em ratos não verificou nenhuma diferença significativa macroscopicamente. Já no estudo de Santos et al. (2006), que realizou avaliações morfológicas e morfométricas, não foi verificada nenhuma melhora histológica.

Objetivos da presente invenção

[019] Face a isso, a presente invenção objetivou demonstrar a ação de géis contendo diferentes concentrações do extrato em acetato de etila das folhas de *C. pachystachya* sobre a cicatrização de feridas e seu efeito antioxidante, por meio de testes pré-clínicos em modelo de cicatrização de feridas cutâneas cirúrgicas em ratos Wistar.

Descrição da Invenção e Forma de Preparo da formulação líquida contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* Trécul

[020] As folhas de *Cecropia pachystachya* foram secas em local fresco e à temperatura ambiente (25°C). Este material seco foi então triturado e submetido à extração por maceração estática com hexano por 24 h. Após essa etapa, a parte líquida foi filtrada, e o material vegetal passou por novo processo de extração, agora com acetato de etila, por 48 h. Este extrato foi concentrado à pressão reduzida, utilizando-se um evaporador rotatório para se obter o extrato de *C. pachystachya* em acetato de etila (ECP).

[021] O extrato obtido foi adicionado a uma formulação farmacêutica em gel que foi utilizada nos ensaios *in vivo* para a avaliação do potencial cicatrizante desse extrato. Para o preparo desse produto utilizou-se o gel base de carbopol que possui formulação conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Tabela da composição do gel contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* 2% ou 5%

Carbopol	1%
Álcool	4%
Nipagin	0,3%
Propilenoglicol	5%
Água destilada	85%

[022] Para preparar o gel utilizado nos tratamentos, duas concentrações do extrato de *C. pachystachya* em acetato de etila (ECP) a 2% ou 5% foram testadas e incorporadas separadamente. ECP foi umectado aos poucos com 0,35% de lauril sulfato de sódio e 3% de glicerina. Uma vez umectado, incorporou-se o extrato em base de gel de carbopol 1%. O gel contendo ECP foi acondicionado em um frasco apropriadamente limpo e seco e armazenado em geladeira.

Descrição dos experimentos

[023] Para determinar os perfis cromatográficos da amostra de *Cecropia pachystachya* foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos e injetor automático. Para separação das substâncias empregou-se coluna de fase reversa (25 cm X 4,6 cm X 5 µm) e um gradiente linear dos solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H_3PO_4) e B (acetonitrila: água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H_3PO_4) variando de 0% - 100% B em 30 min; o fluxo foi 1 ml/min. Após 44 min, o programa de eluição retornou à condição inicial; o volume de injeção foi de 10µl e a temperatura mantida a 25° C durante a análise. A detecção foi feita em 330nm. Ácido clorogênico, orientina e isoorientina foram utilizados como padrões externos na concentração de 1 mg/mL.

[024] Para a realização da atividade cicatrizante foram utilizados ratos albinos machos Wistar com 60 dias, que pesavam entre 200 e 300 g. Os animais foram provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF e foram submetidos a um período de adaptação de 72 h antes da realização do experimento. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas plásticas sendo mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura (22 °C), com acesso livre à água e ração . Todos os protocolos e procedimentos encontravam-se de acordo com o estabelecido

pelos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF sob o protocolo nº 050/2012.

[025] Os animais foram distribuídos em 3 grupos de 16 animais (n=16) denominados: grupo controle, grupo de tratamento com gel de ECP 2% e grupo de tratamento com gel de ECP 5%

[026] Cada um desses 3 grupos foi dividido em 4 subgrupos de 4 animais cada (n=4), para a avaliação morfológica das feridas nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias de tratamento.

[027] O ensaio foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita por Sartor et al. (2010), com algumas modificações. Para realização do procedimento cirúrgico (realização das feridas), os ratos foram anestesiados com uma associação de quetamina e xilazina (90 mg/Kg e 10 mg/kg) por via intraperitoneal. Após serem colocados em decúbito ventral, os animais foram tricotomizados na região dorsocostal com uma máquina para epilação com pente de 1,2 mm. A antissepsia foi realizada com álcool 70%. Com um *punch* metálico de 10 mm de diâmetro removeu-se um fragmento cilíndrico de pele com auxílio de tesoura e pinça anatômica, até a exposição da fáscia muscular toracolombar. A hemostasia foi realizada por compressão manual local com gaze esterilizada. Todo procedimento foi realizado de acordo com protocolo de procedimentos e por pessoal qualificado. Após a cirurgia os animais foram recolocados nas gaiolas individualizadas.

[028] As feridas cutâneas foram tratadas topicamente com gel de carbopol 1% (grupo controle), ECP 2% ou ECP 5% no volume de 200 µL. O tratamento foi realizado uma vez ao dia com auxílio de seringas plásticas, durante os períodos pré-estabelecidos de 3, 7, 14 e 21 dias para cada subgrupo.

[029] A evolução clínica das feridas foi avaliada diariamente para verificação da presença de secreção, crostas, necrose e infecções secundárias. Ao final de cada tratamento os ratos foram eutanasiados com injeção intraperitonial com aprofundamento anestésico de quetamina e xilazina.

[030] Após a eutanásia, foi removida de cada animal uma amostra excisional elíptica englobando a área em processo de cicatrização, com margem cirúrgica de 0,5 cm, e com profundidade até a fáscia dorsal muscular. Os fragmentos foram identificados e fixados em solução de formaldeído a 10%, sendo que cada peça foi previamente aderida a papel filtro para se evitar deformações do fragmento durante a fixação. Após o tempo mínimo de 48 h para a fixação, e após o estudo macroscópico e clivagem, o material foi submetido à técnica histológica de rotina, incluindo as etapas de desidratação gradativa, diafanização, impregnação e emblocamento em parafina. A partir de cada bloco de parafina foram realizados cortes de 5 µm de espessura, distendidos em lâminas de microscopia, as quais foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE – corantes de rotina), Alcian blue (cora mucopolissacarrídeos ácidos – mucina, substância fundamental mais abundantes nos tecidos conjuntivos jovens) e Tricrômico de Masson (cora diferencialmente as fibras colágenas do tecido conjuntivo de verde, o tecido muscular de verde pardo, os núcleos de azul escuro e o citoplasma e fibras musculares de rosa) e montadas para a análise histopatológica.

[031] Os cortes foram analisados sob microscopia de luz para a verificação da reparação tecidual. Para isso, foram consideradas a presença de ulceração, congestão vascular, edema, infiltrado inflamatório de neutrófilos e mononucleares, proliferação vascular e fibroblástica, colagenização e reepitelização.

[032] Foram capturadas imagens da microscopia das lâminas através do programa eletrônico Image Pro-Plus 4.5 Media Cybernetics ™ acoplado a um microcópio óptico Olympus BX51.

[033] Para análise quantitativa da luz dos vasos sanguíneos, as lâminas submetidas à coloração HE foram analisadas a partir da avaliação de toda extensão dos cortes, selecionando-se cinco áreas para a captura digital por sistema computadorizado Image Pro-Plus 4.5 Media Cybernetics ™, por meio de câmera digital acoplada a microscópio óptico Olympus BX51. As contagens obtidas nos cinco campos diferentes de cada amostra foram realizadas através

do programa semiautomático ANATI QUANTI 2.0, desenvolvido pelo Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Todas as imagens digitalizadas foram padronizadas quanto à intensidade de luz do microscópio e altura do condensador.

[034] Não foram contados vasos com corte tangencial que não atingiram a luz. A contagem dos cinco campos e o resultado de cada animal foram expressos por meio de média aritmética simples, assim como o total das contagens de cada grupo.

[035] A análise estatística dos resultados obtidos de cada grupo foi realizada por meio do teste de variância ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnet para a análise histomorfométrica. O software SPSS 18.0 foi utilizado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valores de $p < 0,05$.

Efeitos da administração de ECP 2% e ECP 5% em feridas de ratos

[036] Clinicamente, as feridas cutâneas estavam com as bordas eritematosas e recobertas por crosta úmida após o procedimento cirúrgico e anteriormente à administração tópica dos tratamentos.

[037] As feridas dos grupos controle e tratados com ECP 2% e ECP 5% apresentaram características semelhantes, porém os grupos tratados apresentaram crostas mais espessas e secas, e uma epitelização aparentemente mais precoce que o grupo controle, ao longo de 21 dias. No início do processo inflamatório, logo após a formação da lesão cutânea cirúrgica, formou-se um exsudato fibrinoso na superfície, que ao entrar em contato com o ar, deu origem a uma crosta. Os grupos tratados com ECP 2% e ECP 5% apresentaram crostas mais espessas, secas e escuras, e uma epitelização macroscopicamente mais precoce que o grupo controle, ao longo dos 21 dias. Esta além de ter favorecido a hemostasia, protegeu o leito da úlcera e o tecido em formação, conferindo uma proteção mecânica à região de reparo.

[038] Decorridos três dias após o procedimento, as feridas do grupo controle apresentaram crosta fina e úmida e de coloração castanha avermelhadas, enquanto os grupos tratados apresentaram uma ferida recoberta com crostas enegrecidas, muitas vezes esverdeadas devido à cor do próprio gel do extrato de *C. pachystachya*. Tais crostas se apresentaram mais secas e proeminentes, com borda irregular e elevações, porém sem exsudato. No sétimo dia após a realização da ferida, o grupo controle apresentou feridas recobertas por crostas mais eritematosas, finas e úmidas. O grupo ECP 2% apresentou crostas mais grossas sobre as feridas, porém mais friáveis que as do grupo ECP 5%. Neste grupo, as bordas da ferida se apresentaram mais epitelizadas e a crosta era rígida e seca.

[039] Ao décimo quarto dia, as feridas apresentavam-se clinicamente semelhantes entre os grupos; e no vigésimo primeiro dia de pós-operatório, as feridas dos animais de todos os grupos estavam visualmente epitelizadas, com a região do reparo mais clara, lisa, brilhante e alopécica, além de repilação adjacente.

[040] Microscopicamente, os grupos já apresentaram algumas diferenças relevantes após três dias do pós-cirúrgico. O grupo controle apresentou exuberante atividade inflamatória caracterizada por considerável edema, aumento da permeabilidade capilar e da migração celular de leucócitos para a região da ferida, formando junto com o plasma o exsudato inflamatório. Apesar de apresentar um edema menos pronunciado, o grupo ECP 2% caracterizou-se por ectasia e congestão vascular além de intenso infiltrado celular de polimorfonucleares neutrófilos. O grupo ECP 5% já se mostrou diferenciado ao apresentar discreto edema e leve infiltrado inflamatório, com um estágio de reparo mais precoce evidenciado pela coloração Alcian blue, indicando uma deposição de matriz extracelular com uma maior deposição de mucopolissacarídeos. Apesar de se encontrarem no mesmo período de tempo do processo cicatricial, essas informações demonstram que o gel de *C. pachystachya* na concentração de 2% e, principalmente, na concentração de 5%, apresentou ação anti-inflamatória, o que levou a encurtamento da fase de

inflamação, direcionando a uma antecipação do processo de reparo nesses grupos.

[041] É importante ressaltar que fibroblastos produzem a substância hialinizada, composta por mucopolissacarídeos, que estão envolvidos com a produção e orientação das fibras colágenas. Em torno de quatro a cinco dias estas células predominam no tecido de granulação, alcançando o máximo entre o sétimo e o 14º dia após a injúria. Porém, para o grupo ECP 5% foi observado já ao terceiro dia após a injúria, um discreto depósito de mucopolissacarídeos, evidenciado pela coloração Alcian blue, o que indica que o gel nesta concentração induziu um avanço considerável no processo de cicatrização.

[042] No sétimo dia, histologicamente, o grupo controle apresentou reepitelização e alguma atividade inflamatória aguda com um tecido mais frouxo, maior edema e proliferação celular. A neoformação vascular se mostrou de moderada a intensa. O mesmo foi observado para o grupo tratado com ECP 2%. Por outro lado, o grupo ECP 5% apresentou uma melhor organização do reparo tecidual com a diminuição do tecido de granulação e remodelação inicial evidenciada pela aparente organização dos feixes de fibras colágenas. Assim, apesar do tecido de granulação já estar presente em todos os grupos, observou-se que o grupo ECP 5% apresentou um processo de reparação mais avançado, evidenciado pela presença de infiltrado inflamatório misto, ou seja, a presença de mononucleares (linfócitos e histiócitos) e diminuição do tecido de granulação. Uma vez que a evolução do tecido de granulação é geralmente observada em torno do 10º dia de reparo tecidual, ressalta-se que os resultados apresentados pelos grupos ECP 2% e 5%, que mostraram antecipação do processo cicatricial para o 7º dia, são de relevante importância.

[043] À análise histológica ao 14º dia constatou um discreto espessamento da epiderme regenerada nos animas do grupo ECP 5%. Ainda que a neocolagênese não tenha sido muito diferenciada do grupo controle, ECP 2 % e 5% apresentaram diminuição da neoformação vascular e da celularidade com uma reparação tecidual discretamente melhor que a do controle. Essa redução na neovascularização sugeriu que a reação inflamatória não foi duradoura e,

por conseguinte, o processo de reparação tecidual apresentou-se mais avançado. Nesse período do experimento, os grupos já demonstraram o tecido de granulação mais rico em fibroblastos e foi possível observar um contraste entre a derme papilar e a reticular nos animais tratados com ECP 2% em relação aos tratados com ECP 5% e, principalmente, com os animais do controle negativo, que apresentaram um tecido mais jovem e homogêneo. Ainda assim, proliferação fibroblástica e deposição de fibras colágenas foram maiores para os grupos tratados com os géis de *C. pachystachya,* indicando a abreviação do processo reparador para estes grupos.

[044] Foi observado que, ao 14° dia, o grupo ECP 5% apresentou um processo de reepitelização com a formação de uma epiderme discretamente hiperplásica. Essa característica indica positivamente o estímulo de proliferação que ocorre nesta região, sendo que o grupo ECP 2% apresentou uma epiderme mais retificada, típica de uma fase mais avançada do processo de reparo, característica observada para o mesmo grupo ao sétimo dia de tratamento.

[045] A análise histológica após 21 dias de tratamento revelou que apesar de todos os grupos estarem na fase de remodelação, os grupos tratados com ECP 2% e 5% apresentaram maior padrão organizacional no processo de reparo tecidual, indicando que o processo de cicatrização estava mais bem estabelecido. O grupo controle ainda estava em um processo moderado de neovascularização, enquanto os grupos tratados com o gel contendo ECP a 2 e 5% já possuíam uma grande organização e horizontalização das fibras colágenas, embora a proliferação de fibroblastos mostrou-se semelhante entre os grupos controle e tratados. Ressalta-se que a presença de colágeno foi notável desde o início do tratamento para o grupo ECP 5%, embora aos 21 dias, o reparo tissular foi mais evidente, tanto para o grupo ECP 5% como também para o grupo ECP 2%. Apesar da hiperplasia epidérmica observada no 14° dia no grupo ECP 5%, observou-se, no 21° dia, uma diminuição na proliferação epitelial, secundária à diminuição do estimulo inflamatório dérmico, com consequente adelgamento e retificação epidérmica.

[046] O número de vasos foi estatisticamente igual (p> 0,05) entre os grupos controle, ECP 2% e ECP 5% aos 3 e 21 dias de tratamento. Mas no sétimo e no décimo quarto dias após a cirurgia, o número de vasos sanguíneos entre os grupos foi significativamente diferente. Aos 7 dias, os grupos ECP 2% e ECP 5% apresentaram vasos em maior quantidade do que o grupo controle, e o grupo ECP 2% foi estatisticamente diferente do grupo controle. Aos 14 dias ECP 2% e ECP 5% foram estatisticamente diferentes entre si, com ECP 5% apresentando uma menor quantidade de vasos sanguíneos.

[047] Um resumo dos achados acima descritos encontra-se na tabela a seguir (Tabela 2):

Tabela 2: Tabela do resumo dos achados histopatológicos

	Controle	**ECP 2%**	**ECP 5%**
3 dias	- Intenso edema - Intensa infiltração inflamatória	- Discreto edema - Congestão vascular e infiltrado de PMN	- Discreto edema - Discreta infiltração inflamatória - Discreta e antecipada deposição de matriz extracelular e mucopolissacarídeos
7 dias	- Edema - Proliferação celular - Intensa angiogênese	- Discreto edema - Proliferação celular - Intensa angiogênese	- Menor tecido de granulação - Deposição expressiva e organizada de tecido conjuntivo frouxo
14 dias	- Intensa angiogênese. - Neocolagênese.	- Discreta angiogênese -Neocolagênese com tecido de granulação rico em fibroblastos. - Regressão endotelial.	- Discreta angiogênese - Neocolagênese com tecido de granulação rico em fibroblastos. - Regressão endotelial.

21 dias	- Angiogênese moderada. - Matriz extracelular em organização.	- Melhor padrão de organização das fibras de colágeno.	- Melhor padrão de organização das fibras de colágeno.

[048] Pode-se observar que a antecipação da epitelização observada no grupo ECP 5% auxilia no reparo de lesões cirúrgicas, principalmente em tecidos livres de doenças secundárias, enquanto o tratamento com ECP 2%, por acelerar a evolução do reparo da derme, seria um bom agente no reparo de lesões associadas a doenças, em que a "reconstituição" da derme é prejudicada pelos inúmeros fatores adversos.

[049] Foi identificada em ECP a presença de ácido clorogênico, orientina e isoorientina. Especula-se que os componentes encontrados no extrato em acetato de etila de *C. pachystachya* como ácido clorogênico, e os flavonoides orientina e isoorientina possam estimular a reepitelização para melhorar a cicatrização da ferida ao reduzirem a peroxidação lipídica que deteriora os constituintes celulares e aumentarem a síntese de colágeno fundamental para a realização da cicatrização.

REIVINDICAÇÕES

1. **FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO EXTRATO DE EMBAÚBA COM ATIVIDADE CICATRIZANTE**, caracterizada por apresentar uma formulação básica constituída por carbopol, álcool, Nipagin, propilenoglicol e água destilada.

FIGURAS

Figura 1

Carbopol	1%
Álcool	4%
Nipagin	0,3%
Propilenoglicol	5%
Água destilada	85%

Figura 2

	Controle	**ECP 2%**	**ECP 5%**
3 dias	- Intenso edema - Intensa infiltração inflamatória	- Discreto edema - Congestão vascular e infiltrado de PMN	- Discreto edema - Discreta infiltração inflamatória - Discreta e antecipada deposição de matriz extracelular e mucopolissacarídeos
7 dias	- Edema - Proliferação celular - Intensa angiogênese	- Discreto edema - Proliferação celular - Intensa angiogênese	- Menor tecido de granulação - Deposição expressiva e organizada de tecido conjuntivo frouxo
14 dias	- Intensa angiogênese. - Neocolagênese.	- Discreta angiogênese -Neocolagênese com tecido de granulação rico em fibroblastos. - Regressão endotelial.	- Discreta angiogênese - Neocolagênese com tecido de granulação rico em fibroblastos. - Regressão endotelial.
21 dias	- Angiogênese moderada. - Matriz extracelular em organização.	- Melhor padrão de organização das fibras de colágeno.	- Melhor padrão de organização das fibras de colágeno.