



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

(21) BR 102018069288-7 A2



(22) Data do Depósito: 21/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/03/2020

(54) **Título:** FLUIDO COLOIDAL AGNPS-S.AROMATICUM@ALGINATO POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A CANDIDA ALBICANS

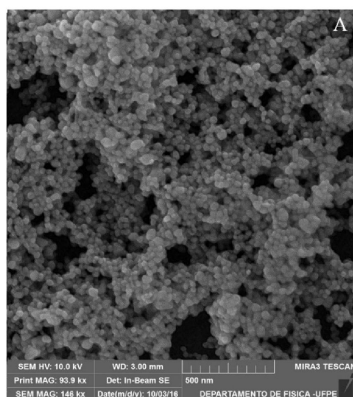
(51) **Int. Cl.:** A01N 65/28; A01N 25/34; A01N 59/16; A01N 25/04; A01P 1/00.

(52) **CPC:** A01N 65/28; A01N 25/34; A01N 59/16; A01N 25/04.

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

(72) **Inventor(es):** SEVERINO ALVES JUNIOR; CLÁUDIO AUGUSTO GOMES DA CÂMARA; GLÁUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA; IVALDO RODRIGUES DE ARAÚJO; ROBERTA CLÁUDIA SANTOS NEVES; MARCOS VINÍCIUS DA SILVA PAULA; MILENA MARTINS CORREIA DA SILVA; AMANDA MARIA DA SILVA.

(57) **Resumo:** FLUIDO COLOIDAL AgNps-S.aromaticum@alginato POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A Candida albicans É divulgado, nesta patente de invenção, um fluido coloidal formado por alginato, suplementado com nanopartículas de prata e óleo essencial das folhas de Syzygium aromaticum, apresentando atividade contra o microrganismo Candida albicans. O fluido foi obtido a partir da hidratação de 2g do pó de alginato em 80mL de água ultrapura, estéril, com 20mL da solução de nanopartículas, a fim de que a concentração final de nanopartículas seja de 7,4µg/mL no fluido coloidal. Após a suplementação com a suspensão coloidal, uma alíquota de 20mL foi suplementada com a concentração de 3,12% do óleo essencial. O fluido AgNps-S.aromaticum@alginato apresentou concentração mínima inibitória, para o microrganismo selecionado, igual a 0,039% e 0,0925µg/mL, referentes ao óleo essencial e às nanopartículas de prata, respectivamente.



FLUIDO COLOIDAL AgNps-*S.aromaticum*@alginato POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A *Candida albicans*

01. A presente patente de invenção aborda a obtenção do fluido coloidal formado por alginato, suplementado com nanopartículas de prata, e óleo essencial, oriundo das folhas de *Syzygium aromaticum*, possuindo atividade antifúngica.

02. Atualmente, a população mundial vem sofrendo com a problemática da resistência a antimicrobianos, capacidade adquirida por microrganismos, muitas vezes pelo uso indiscriminado de antimicrobianos; assim, desenvolveram resistência, portanto, este problema é, agora, reconhecido como um desafio global emergente.

03. Devido a este problema da redução da eficácia dos antimicrobianos, resultando em milhares de mortes em todo o mundo, novos antimicrobianos, alternativos, se fazem urgentemente necessários para resolver o problema da resistência a multidrogas.

04. A partir do advento da nanotecnologia, diversos nanomateriais foram desenvolvidos com propósitos diversos; entre estes materiais, alguns apresentaram atividade frente a microrganismos.

05. As nanopartículas de prata, cujo potencial antimicrobiano está diretamente associado a seu tamanho reduzido; no entanto, ainda existem dúvidas no que diz respeito ao mecanismo de ação destas partículas, se ele é específico delas ou se está associado à liberação de íons Ag⁺.

06. Além das pesquisas envolvendo a utilização de nanomateriais como agentes antimicrobianos, pesquisas envolvendo a Química de produtos naturais, e a Fitoquímica, buscam novas substâncias e princípios ativos.

07. Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de bioativos, utilizados na produção de inúmeros fármacos; sendo assim,

inúmeras plantas vêm sendo utilizadas na busca por novos insumos, provenientes de vegetais.

08. Dentre os derivados vegetais mais conhecidos por suas atividades tratativas e curativas, os óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* apresentam diversas propriedades biológicas, entre elas, a atividade contra uma ampla variedade de microrganismos.

09. Essas propriedades biológicas são atribuídas à presença de fenóis substituídos, como o eugenol, poderoso antimicrobiano.

10. Uma estratégia de potencializar a atividade antimicrobiana de um óleo essencial pode ser através da associação entre nanopartículas de prata, devido ao efeito sinérgico, pois as NP se ancoram ou penetram na membrana celular, formando poros de liberação de radicais livres, aumentando a permeabilidade celular e, conseqüentemente, o fluxo do agente através da membrana, levando o microrganismo à morte.

11. Desta forma, a presente invenção propõe utilizar fluidos coloidais, AgNps-*S.aromaticum*@alginato, frente a um fungo levedureforme, *Candida albicans*.

12. Nesta patente, relata-se a obtenção de um fluido coloidal, formado pelo alginato com nanopartículas de prata e óleo essencial do *Syzygium aromaticum*, para ser utilizado no combate a infecções causadas por *Candida albicans*.

13. A obtenção do fluido coloidal ocorreu em três etapas.

14. Na primeira etapa, foi realizada a síntese das nanopartículas de prata. As nanopartículas foram produzidas através do método descrito em Lee *et al*, 1982. Inicialmente, foi aquecido 125mL da solução de AgNO₃, com concentração de 1mM, em um *erlenmeyer*, até a ebulição; em seguida, foi adicionado 5mL de Na₃C₆H₅O₇, solução a 1%, na proporção de uma gota por segundo; a solução foi mantida em ebulição até a transição para a coloração amarelo pálido; esta coloração é indício da formação das nanopartículas. O *erlenmeyer* foi mantido sobre

a chapa de aquecimento após seu desligamento, por cerca de um minuto, até que a solução atinjisse a coloração amarela; em seguida, a mesma foi arrefecida lentamente, sob agitação, em um banho à temperatura de 20°C, até a temperatura ambiente.

15. A segunda etapa consistiu na obtenção do fluido de alginato, a qual seguiu metodologia descrita por Rassu *et al*, 2016, com as seguintes modificações: o fluido de alginato foi produzido a partir da hidratação do pó de alginato em um béquer, a uma proporção de 2% m/v; para facilitar a hidratação do pó, ele foi misturado ao equivalente, em massa, de álcool etílico absoluto; em seguida, esta mistura foi adicionada a água ultrapura estéril, sob agitação vigorosa, com o auxílio de um agitador magnético (Fisatom 752A), com aquecimento a 40°C.

16. A última etapa foi referente à obtenção do fluido formado pelo alginato com nanopartículas de prata e óleo essencial, oriundo das folhas de *Syzygium aromaticum* (AgNps-*S.aromaticum*@alginato), com a suplementação sendo realizada a partir da hidratação de 2g do pó de alginato em 80mL de água ultrapura, estéril, com 20mL da solução de nanopartículas, a fim de que a concentração final de nanopartículas seja de 7,4µg/mL, no fluido coloidal. Após a suplementação com a suspensão coloidal, uma alíquota de 20mL do fluido foi suplementada com a concentração de 3,12% do óleo essencial, em relação ao volume do fluido, obtido anteriormente.

17. A análise GC-MS dos óleos essenciais foi realizada utilizando um sistema Varian 220-MS IT GC acoplado a um detector de massa seletivo, o espectrômetro de massa em EI 70eV, com um intervalo de varredura de 0,5s e fragmentos de 40 a 550Da. Equipado com mesma coluna e programa de temperatura do experimento de GC-FID, com os seguintes parâmetros: gás portador = hélio; taxa de fluxo = 1mL/min; modo dividido (1:30); volume injetado = 1µL de solução diluída (1/100) de óleo em n-hexano.

18. A identificação de componentes foi baseada nos índices de retenção GC-MS, com referência para as séries de n-alcanos C8-C40, calculados usando a equação van Den Dool e Kratz (van Den Dool e Kratz, 1963), e por combinação computacional com a biblioteca espectral de massa do sistema de dados GC-MS (versão NIST 14, e WILEY versão 11), e co-injeção com padrões autênticos, bem como, com outros espectros de massa publicados. As porcentagens de área foram obtidas a partir da resposta GC-FID, sem o uso de um padrão interno ou fatores de correção.

19. Os espectros na região do UV-Vis foram obtidos com o espectrofotômetro modelo CHEN2000-UV-Vis, da *Ocean Optics Inc.* O tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) das nanopartículas foi determinado por DLS, utilizando o equipamento (Nano ZS90, Malvern). Medidas de potencial ζ foram realizadas com instrumento de eletroforese de partícula (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern). A morfologia das amostras de nanopartículas de prata foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente fixadas a um pedaço de fita adesiva dupla face de carbono, apoiada sobre um suporte metálico. As imagens de MEV para as amostras foram obtidas utilizando um microscópio Tescan, modelo Mira3, com voltagem de 10kV. As medidas reológicas foram realizadas à temperatura de 25°C, em um reômetro de tensão controlada, modelo DHR, da *TA Instruments*, com geometria placa-placa, sendo a placa de aço inoxidável, com diâmetro de 40mm e espaçamento de 100µm entre as placas.

20. O espectro de ação antimicrobiana foi determinado pela técnica da inibição da multiplicação microbiana, por difusão em ágar e microdiluição, de acordo com a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os experimentos para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados no laboratório coleção de microrganismos (UFPEDA), da Universidade Federal de Pernambuco.

21. Os óleos essenciais, oriundos das folhas do *Syzygium aromaticum*, apresentaram odor característico, com tonalidade amarela clara.

22. A análise por CG e CG-EM dos óleos permitiu a identificação de um total de 9 compostos, a partir dos óleos folheares. O óleo presente nas folhas apresentou, em sua constituição, de 66,56% de eugenol, 15,91% de limoneno, 1,68% de α -humuleno, 0,99% de 1,8-cineole, 0,70% de α -pineno, 0,44% de sabineno, 0,34% de β -pineno e 0,11% de δ -2-careno, representando uma porcentagem de 98,33%.

23. A avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais presentes nas folhas, frente ao microrganismo selecionado, foi determinada (Tabela 1) pela mínima concentração inibitória (CMI), ou concentração mínima, capaz de inibir o crescimento ou desenvolvimento do microrganismo, quando exposto ao mesmo, sendo observada a atividade antimicrobiana do óleo frente à *Candida albicans*.

Tabela 1: CMI dos óleos essenciais presentes nas folhas

Microrganismo	CMI
<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)	3,12%

24. A morfologia das nanopartículas de prata foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 1 revelou que as nanopartículas possuem tamanho característico com o comprimento de onda específico, de acordo com Solomon *et al*, 2007. Em conformidade com o método de Turkevich *et al*, 1951, e Lee *et al*, 1982, utilizado na síntese das nanopartículas, era esperado que as partículas apresentassem entre 50 e 100nm, sendo observado que as menores partículas possuem, aproximadamente, 35nm, enquanto as maiores possuem 50nm.

25. A absorção na região eletrônica do UV-Vis revelou que as nanopartículas de prata (Figura 2) produzem ondas de oscilação coletiva de elétrons de superfície, também conhecidas como plasmôns de superfície, o que caracteriza a absorção típica, exibindo pico próximo de 400nm. Esta ressonância plasmônica ocorre devido à excitação coletiva dos elétrons na interface isolante/condutor; tal característica é observada em nanopartículas metálicas, onde o tamanho e a forma são os fatores determinantes primordiais, na faixa de absorção onde ocorre a ressonância. Outro fator observado é a variação na absorção de nanopartículas metálicas, onde ocorre o deslocamento no comprimento de onda, à medida que ocorre o aumento do volume das mesmas.

26. Através do resultado da caracterização em UV-Vis, foi possível perceber que a absorção ocorre em torno de 420nm, como já era esperado devido ao método adotado, pois a redução em $C_6H_5O_7Na_3$ produz partículas entre 50nm e 100nm, apresentando coloração amarela, que pode variar do amarelo pálido ao amarelo mais escuro (Figura 3). A partir da comparação com a correlação entre comprimento de onda (nm) e tamanho de partícula (nm), proposto por Solomon *et al*, 2007, esperava-se que as partículas apresentassem tamanho em torno de 35nm a 50nm, que foi possível de ser comprovado após a obtenção da imagem por microscopia eletrônica de varredura.

27. A determinação do tamanho das nanopartículas de prata e do potencial zeta (ζ) é apresentada nas Figuras 5 e 6, respectivamente. De acordo com o observado na Figura 4, as nanopartículas apresentaram tamanho superior a 100nm. O resultado de potencial ζ (Figura 6) foi satisfatório, pois o potencial apresentado é inferior a - 30mV, indicativo de uma boa estabilidade na dispersão coloidal, de acordo com o observado por Mallakpour *et al*, 2016.

28. Através da Tabela 2, foi observada a atividade antimicrobiana apresentada pelas nanopartículas frente ao microrganismo testado,

onde foi determinada a concentração mínima inibitória, assim como a concentração mínima bactericida, as quais foram 0,04625µg/mL e 0,04625µg/mL, respectivamente.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata

Substância	Microrganismo	CMI	CMB
Nanopartículas	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)	0,04625µg/mL	0,04625µg/mL

29. Os testes da avaliação antimicrobiana frente à *Candida albicans* foram realizados em placas de 96 poços, partindo da amostra com concentração de 3,12% de óleos essenciais e 7,4µg/mL de nanopartículas de prata. Foram aplicados 20µL do compósito em 180µL do meio de cultura, no primeiro poço, e realizadas sucessivas diluições a partir deste. Desse modo, o primeiro poço consta com concentração equivalente a 0,312% em óleos e 0,74µg/mL em nanopartículas.

30. Na Tabela 3, é visualizado que, mesmo a baixas concentrações, tanto de óleos essenciais como da solução de nanopartículas, a composição apresenta atividade frente ao microrganismo. Apresentando o valor de CMI para *Candida albicans* UFPEDA 1007, com inibição a uma concentração de 0,039% e 0,0925µg/mL para óleos essenciais das folhas e para nanopartículas, respectivamente. Além da determinação da atividade inibitória, foi realizada a determinação da ação bactericida, para que fosse delimitada a concentração capaz de matar o microrganismo testado, apresentados na Tabela 4.

Tabela 3: CMI da composição de óleos folheares e nanopartículas de prata

Substância	Microrganismo	CMI O.F.	CMI AgNp
------------	---------------	----------	----------

Nanopartículas + óleo folha	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)	0,039%	0,0925µg/mL
--------------------------------	---------------------------------------	--------	-------------

31. A atividade antimicrobiana da composição de óleos folheares e nanopartículas (Tabela 3) apresentou boa atividade, pois ela apresenta concentrações muito reduzidas dos antimicrobianos, apresentando atividade frente ao microrganismo testado.

Tabela 4: CMB da composição de óleos folheares e nanopartículas de prata

Substância	Microrganismo	CMB O.F.	CMB AgNp
Nanopartículas + óleo folha	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)	0,078%	0,185µg/mL

32. Sendo notória a atividade sinérgica exercida pela relação óleo essencial e as nanopartículas de prata, esta mesma relação é citada por Szweda *et al*, 2015, com a utilização do *Cinnamomum*, com a relação óleo essencial de *Oreganum spp.* e *Cymbopogon citratus*; esta última, testada em pele de animais.

33. Conforme visto na Figura 6, foi observado, para a solução à base de alginato de sódio, na concentração de 2% (m/v), um comportamento de fluido newtoniano (determinado pelo método rotacional).

34. De acordo com o gráfico, é observado que houve um aumento da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, seguindo a lei de escoamento de Newton, sendo assim, este fluido pode ser classificado como newtoniano. Quando comparamos com a maioria dos relatos sobre alginato de sódio em concentrações variadas, observa-se um comportamento mais não-newtoniano, ou seja, com características

tixotrópicas relevantes. Neste caso, o resultado é uma solução fluida, semelhante aos produtos alimentícios que apresentam essas características, como, por exemplo, leites, vinhos, óleos minerais e mel.

35. As características e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes na descrição detalhada das características e resultados preferidos da invenção, com referência às figuras anexas.

36. Figura 1 - SEM imagem para nanopartículas de prata.

37. Figura 2 - Espectro na região do UV-Vis para nanopartículas de prata.

38. Figura 3 - Suspensão de nanopartículas de prata (A) e feixe de laser atravessando a suspensão de nanopartículas (B).

39. Figura 4 - DLS para as nanopartículas de prata.

40. Figura 5 - Potencial zeta (ζ) da suspensão coloidal de nanopartículas de prata.

41. Figura 6 - Comportamento newtoniano do fluido de alginato de sódio a 2%, de acordo com a tensão de cisalhamento, em função da taxa de cisalhamento.

REIVINDICAÇÕES

1) Fluido coloidal formado pelo alginato com nanopartículas de prata com óleo essencial oriundo das folhas do *Syzygium aromaticum*, **caracterizado por** possuir atividade contra o microrganismo *Candida albicans*.

2) Fluido AgNps-*S.aromaticum*@alginato, **caracterizado pela** suplementação do alginato ser realizada a partir da hidratação de 2g do pó de alginato em 80mL de água ultrapura, estéril, com 20mL da solução de nanopartículas, a fim de que a concentração final de nanopartículas seja de 7,4µg/mL, no fluido coloidal; após a suplementação com a suspensão coloidal, uma alíquota de 20mL do fluido foi suplementada com a concentração de 3,12% do óleo essencial, em relação ao volume do fluido, obtido anteriormente.

3) Fluido coloidal a ser utilizado contra o microrganismo *Candida albicans*, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** possuir o caráter sinérgico entre as nanopartículas de prata e o óleo essencial proveniente das folhas do *Syzygium aromaticum*, contra o microrganismo *Candida albicans*.

FIGURAS

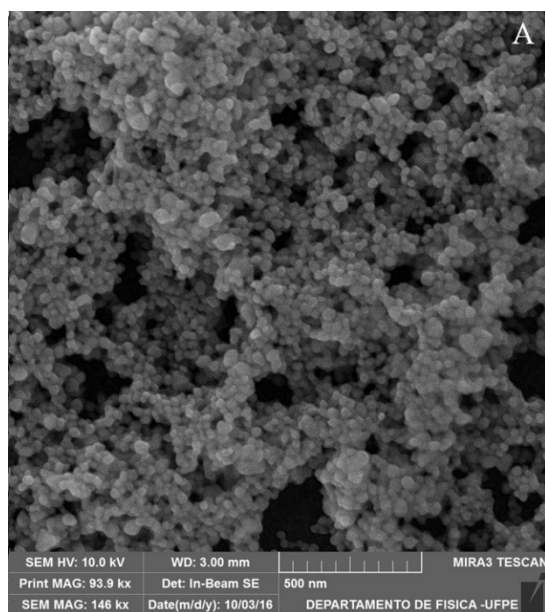


Figura 1

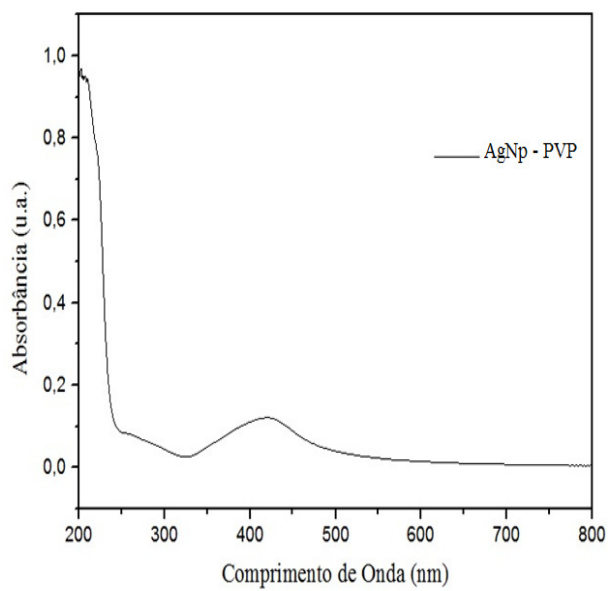


Figura 2

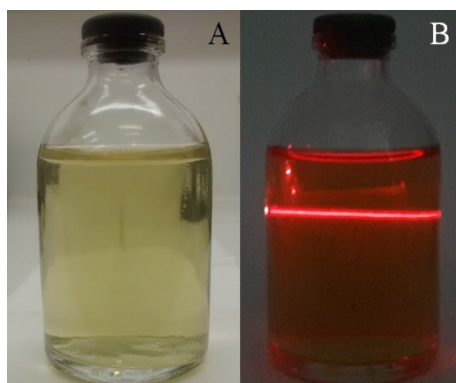


Figura 3

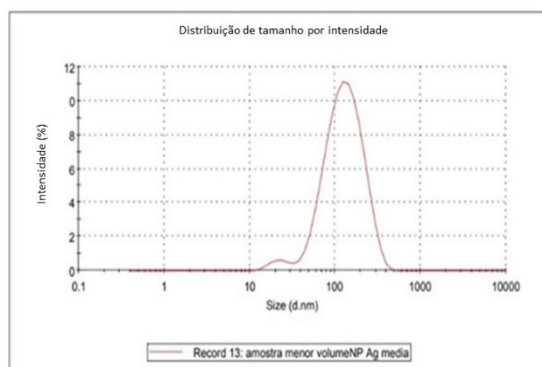


Figura 4

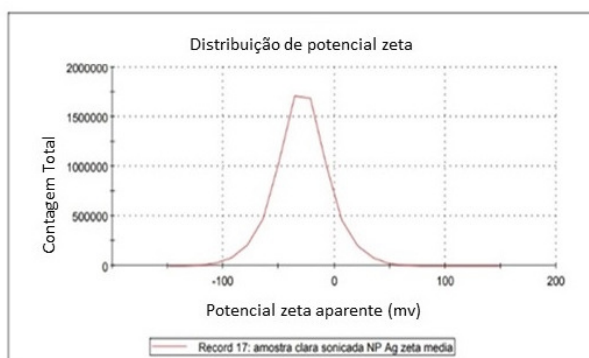


Figura 5

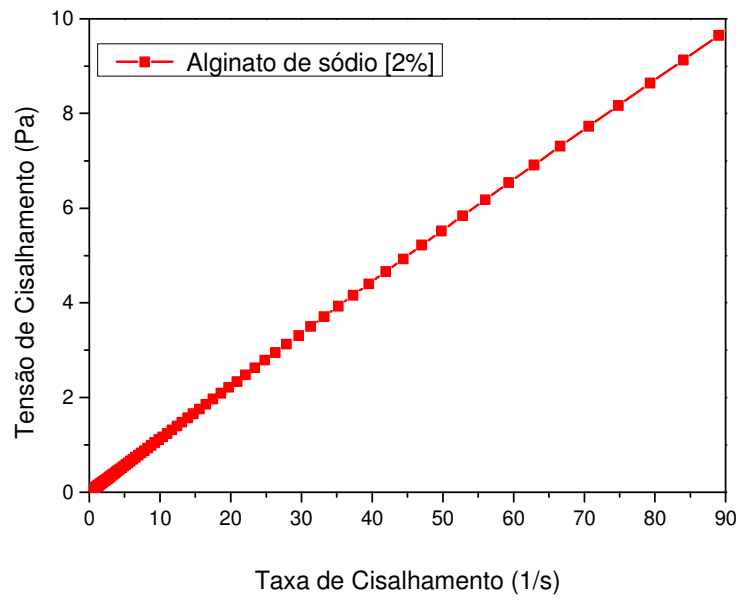


Figura 6

RESUMO**FLUIDO COLOIDAL AgNps-*S.aromaticum*@alginato POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A *Candida albicans***

É divulgado, nesta patente de invenção, um fluido coloidal formado por alginato, suplementado com nanopartículas de prata e óleo essencial das folhas de *Syzygium aromaticum*, apresentando atividade contra o microrganismo *Candida albicans*. O fluido foi obtido a partir da hidratação de 2g do pó de alginato em 80mL de água ultrapura, estéril, com 20mL da solução de nanopartículas, a fim de que a concentração final de nanopartículas seja de 7,4µg/mL no fluido coloidal. Após a suplementação com a suspensão coloidal, uma alíquota de 20mL foi suplementada com a concentração de 3,12% do óleo essencial. O fluido AgNps-*S.aromaticum*@alginato apresentou concentração mínima inibitória, para o microrganismo selecionado, igual a 0,039% e 0,0925µg/mL, referentes ao óleo essencial e às nanopartículas de prata, respectivamente.