



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102014021569-7

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 102014021569-7

(22) Data do Depósito: 29/08/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 22/03/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 9/14; A61K 33/38; A61K 31/085; A61P 31/04.

(54) Título: COMPOSIÇÃO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA E UM ANTIBIÓTICO OBTIDO DE CRAVO-DA-ÍNDIA

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 78640489000153. Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO, Londrina, PR, BRASIL(BR), 86055-900; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 46068425000133. Endereço: RUA ROXO MOREIRA, 1831, Campinas, SP, BRASIL(BR), 13083-592

(72) Inventor: GERSON NAKAZATO; PROFA. DRA. RENATA KATSUKO TAKAYAMA KOBAYASHI; PROF. SUELI FUMIE YAMADA OGATTA; PROF. DR. NELSON EDUARDO DURAN CABALLERO; PROFA. DRA. PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI; PROF. LUCY MEGUMI YAMAUCHI LION; ALEXANDRE TADACHI MOREY; ERICK KENJI NISHIO; RENATA PERUGINI BIASI; GIOVANA CAROLINA BODNAR.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 29/08/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 28/06/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

COMPOSIÇÃO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA E UM ANTIBIÓTICO OBTIDO DE CRAVO-DA-ÍNDIA.

Campo de aplicação

[001] Áreas da saúde humana e veterinária, preferencialmente nas indústrias farmacêuticas, controle de infecções humanas e de outros animais, embalagens, produtos veterinários e curativos.

Campo da Invenção

[002] A presente invenção trata-se de uma composição contendo um antibiótico obtido de cravo-da-índia, 4-Alil-2-Metoxifenol, e nanopartículas de prata (prata biológica obtida através de *Fusarium oxysporum*) com atividade antimicrobiana. O 4-Alil-2-Metoxifenol é um óleo essencial comercial obtido do vegetal cravo-da-índia. A nanopartícula de prata ou prata biológica foi produzida por meio da transformação da prata pelas enzimas do fungo *Fusarium oxysporum*, e posteriormente purificada. A composição apresentou efeito antimicrobiano contra cepas bacterianas e fúngicas de interesse médico.

[003] A presente invenção é importante para o controle microbiano podendo ser utilizados nas áreas da saúde humana e veterinária, preferencialmente nas indústrias farmacêuticas, e no controle de infecções humanas e veterinárias, como antimicrobianos naturais. Também podem apresentar aplicações na indústria alimentícia e odontológica.

Antecedentes da invenção

[004] O uso indiscriminado de antimicrobianos convencionais existentes no mercado proporciona a seleção de cepas microbianas resistentes, havendo a necessidade de obtenção de novas drogas antimicrobianas.

[005] O uso de antimicrobianos naturais têm sido uma das alternativas para o controle de micro-organismos multirresistentes, porém nem sempre com a mesma eficiência dos sintéticos. Por outro lado, os muitos antimicrobianos sintéticos podem apresentar efeitos adversos ao hospedeiro, além do seu alto custo de produção.

[006] Assim, o uso de combinações de antimicrobianos (naturais e/ou sintéticos), tem sido uma eficiente alternativa para o controle microbiano, porém, composições sinérgicas na atividade antimicrobiana entre substâncias são difíceis de serem desenvolvidas.

[007] Nosso grupo de pesquisa tem estudado o uso da nanopartícula de prata como antimicrobiano, bem como associada a outros compostos, podendo apresentar efeitos sinérgicos ou aditivos, já que a própria nanopartícula apresenta efeito antimicrobiano. O 4-Alil-2-Metoxifenol é outro composto que nosso grupo tem estudado e que também apresentou efeito antimicrobiano para nossos micro-organismos.

Sumário da Invenção

[008] A presente invenção compreende a utilização de uma composição com ação antimicrobiana como alternativa para a antibioticoterapia, através de uma mistura de 4-Alil-2-Metoxifenol e nanopartículas de prata (prata biológica obtida através de *Fusarium oxysporum*), resultando em ação sinérgica contra bactérias e aditiva contra fungos, de interesse médico. A combinação destes compostos apresentou um efeito antimicrobiano potencializado, reduzindo a dose dos compostos, assim como os custos e seus efeitos adversos.

[009] Vantagens: Composições sinérgicas apresentam potentes efeitos e grande espectro de ação antimicrobiana. Em casos de resistência aos antimicrobianos convencionais podem ser uma boa alternativa no controle microbiano. A combinação de antimicrobianos pode reduzir o efeito adverso de algumas drogas tóxicas, sem alterar a sua eficiência.

Descrição detalhada da Invenção

1- 4-Alil-2-Metoxifenol

[010] A nomenclatura oficial de acordo com a IUPAC é 4-Alil-2-Metoxifenol. A obtenção do óleo essencial é feita principalmente a partir do vegetal cravo-da-índia, sendo que as folhas chegam a representar aproximadamente 95% do óleo extraído e no cravo (botão floral) varia de 70 a 85%.

2- Obtenção de nanopartículas de prata biológica

[011] O processo de obtenção das nanopartículas de prata foi patenteada [Durán, O.L. Alves, E. Espósito, G.I.M.H. De Souza, P.D. Marcato, “Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizada por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e o tratamento dos efluentes produzidos”, PI0605681-4 (2006)].

[012] O inóculo fúngico foi realizado em meio líquido contendo extrato de malte (2%) e extrato de levedura (0,5%), e o crescimento foi acompanhado durante 6 dias neste meio a 28°C. A biomassa foi filtrada e suspendida em água destilada esterilizada. Aproximadamente 10 g da biomassa de *Fusarium oxysporum* foram transferidas para um frasco cônico contendo 100 mL de água destilada, mantida por 72 h a 28°C. Os componentes da solução aquosa foram separados por filtração. Nesta solução foi adicionada AgNO₃ (10⁻³M), e o material foi incubado por várias horas a 28°C. As nanopartículas de prata foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS).

3- Micro-organismos

3.1- Bactérias

[013] A avaliação do efeito antimicrobiano da combinação foi realizada utilizando as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina BEC 9393, *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina ATCC 25923 e ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027, e *Streptococcus agalactiae* ATCC 18383. As cepas bacterianas fazem parte da coleção bacteriana do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina.

3.2- Fungos

[014] Foram utilizados os seguintes fungos (leveduras): *Candida albicans* ATCC 26790, *Candida tropicalis* ATCC 28707, e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. As cepas fúngicas fazem parte da coleção bacteriana do Laboratório de

Biologia Molecular de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina

4- Testes de atividade antimicrobiana

4.1- Atividade antibacteriana

4.1.1- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

[015] Para ser avaliado o perfil de sensibilidade de diferentes bactérias mediante os compostos 4-Alil-2-Metoxifenol e prata biológica, foi utilizado o método de microdiluição, conforme padronizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards (Clinical and Laboratory Standards Institute)* (CLSI, 2012).

[016] As bactérias foram cultivadas inicialmente em ágar Müller-Hinton (MH) a 37°C durante 24 h, e posteriormente diluídas em salina (0,9% de NaCl) até obter a concentração de 10^8 bactérias/mL. Em seguida, foi realizada uma nova diluição, agora em caldo MH até obter a concentração de 10^6 bactérias/mL. Em placa de microdiluição com 96 poços, foram adicionados 50 µL das suspensões bacterianas em 50 µL de caldo MH contendo diferentes concentrações do composto a ser testado (diluição seriada de 1:2). A placa foi então incubada a 37°C durante 24 h, e o crescimento bacteriano avaliado em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 590 nm. A CIM foi a menor concentração do composto que inibiu o crescimento bacteriano.

4.1.2- Interação sinérgica entre compostos para atividade antibacteriana

[017] Esta metodologia envolveu a montagem de diferentes concentrações para os dois compostos (4-Alil-2-Metoxifenol e prata biológica), de tal forma que as concentrações para um antimicrobiano foi montado nas colunas (vertical) e o de outro nas fileiras (horizontal), conforme demonstrado na Figura 2. No gradiente vertical, foi utilizada um dos compostos (composto 1), enquanto que na horizontal, foram preparados gradientes do outro composto (composto 2). Assim, concentrações diferentes de dois compostos foram combinadas e a menor concentração da combinação que inibiu completamente o crescimento das amostras bacterianas foi determinada.

[018] Na placa de microdiluição foram adicionados 50 µL de caldo MH, exceto na segunda fileira (poços horizontais), na qual foi adicionado o composto 1 diluído em caldo MH (volume final de 100 µL). A partir desta fileira, foram

retirados 50 µL, que foram transferidos para a próxima fileira (terceira fileira horizontal) com o emprego de uma pipeta multicanal. Este procedimento foi repetido até a última fileira. Nesta última, após homogeneização, 50 µL da suspensão foram retirados e desprezados, de forma que no final, todos os poços continham o volume final de 50 µL. Para o composto 2 foi criado um gradiente ao longo das colunas da mesma placa. Para isso, o mesmo procedimento executado para o composto 1 (vertical) foi realizado para o composto 2 (horizontal). Terminado o segundo gradiente, efetuou-se a adição de 50 µL por poço das bactérias em suspensão (10^6 bactérias/mL), conforme mencionado previamente, completando o volume para 100 µL. A placa foi incubada a 37°C durante 18-24 h.

[019] O crescimento bacteriano no teste de interação foi determinado pela leitura da D.O (densidade óptica) no comprimento de onda de 590 nm. A CIM foi considerada a menor concentração de ambos os antibióticos que inibiram o crescimento bacteriano, normalmente visível como um quadrilátero com inibição de crescimento iniciando na extremidade inferior direita da placa.

[020] Para interpretação dos resultados obtidos através desse teste, foi aplicada a fórmula de Fração de Concentração Letal (CHIN et al., 1997).

$$FCL = FCL_A + FCL_B$$

$$FCL_A = \frac{CIM_1(Interacção)}{CIM_1(Separado)}$$

$$FCL_B = \frac{CIM_2(Interacção)}{CIM_2(Separado)}$$

Onde:

FCL é a fração de concentração letal;

CIM₁ (Interação) é o valor de CIM para o composto 1 na interação;

CIM₁ (Separado) é o valor de CIM para o composto 1 separado;

CIM₂ (Interação) é o valor de CIM para o composto 2 na interação;

CIM₂ (Separado) é o valor de CIM para o composto 2 separado;

Portanto se:

$$FCL \leq 0,5 = \textit{Sinergismo}$$

$$0,5 < FCL \leq 1 = \textit{Aditismo}$$

$$1 < FCL \leq 4 = \textit{Indiferente}$$

$$FCL > 4 = \text{Antagonismo}$$

4.2. Atividade antifúngica

4.2.1 Sinergismo pelo método “Checkerboard”

[021] A partir dos resultados de CIM obtidos, o efeito da combinação da nanopartícula e 4-Alil-2-Metoxifenol foi analisado pelo método de “Checkerboard” em placas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 tamponado com 0,165 M de MOPS, com inóculo entre 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. As concentrações de 4-Alil-2-Metoxifenol variaram de 0,001 a 1,0% e da nanopartícula de prata de 1,9 a 60,0 μM . Cada poço apresentava combinações de diferentes concentrações das substâncias testadas e após incubação a 35 °C durante 24 horas o resultado foi verificado pela inibição de crescimento observado pela leitura visual (SCOTT et al., 1995; MARCHETTI et al., 2000). A análise dos resultados foi feita pelo cálculo da Fração de Concentração Letal (CHIN et al., 1997).

Tabela 1- Atividade antibacteriana da interação entre 4-Alil-2-Metoxifenol e nanopartícula de prata.

	CIM (Individual)		CIM (Combinado)		FLC	Interação
	4-Alil-2-Metoxifenol (%)	NanoAg (μM)	4-Alil-2-Metoxifenol (%)	NanoAg (μM)		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,5	62,5	0,125	7,8	0,37	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	62,5	0,06	7,8	0,24	Sinergismo
<i>S. aureus</i> BEC 9393	0,5	62,5	0,06	15,6	0,37	Sinergismo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	62,5	0,25	15,62	0,50	Sinergismo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1	62,5	0,25	15,62	0,50	Sinergismo
<i>S. agalactiae</i> ATCC 18383	0,25	62,5	0,0625	31,25	0,75	Aditismo

Tabela 2- Atividade antifúngica da interação entre 4-Alil-2-Metoxifenol e nanopartícula de prata.

CIM (Individual)	CIM (Combinado)	FLC
------------------	-----------------	-----

	4-Alil-2-Metoxifenol (%)	NanoAg (μM)	4-Alil-2-Metoxifenol (%)	NanoAg (μM)		Interação
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	0,25	15	0,125	30	2,50	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	0,06	7,5	0,07	7,5	1,12	Indiferente
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5	15	0,125	7,5	0,75	Aditismo

5- Descrições dos desenhos

[022] **Figura 1-** Esquema da determinação da Concentração Inibitória Mínima da interação dos méis. **A** – Bactéria em meio ágar MH. **B** – $1,5 \times 10^8$ células/mL, Tubo 0,5. Escala Mac Farland. **C** – $1,5 \times 10^7$ células/mL. **D** – Diluição seriada 1:10. **E** – Leitura em espectrofotômetro (590 nm). **F** – Concentração Inibitória mínima da combinação.

[023] **Figura 2-** Isobolograma mostrando as tendências das curvas. **Sem interação:** (efeito aditivo dos componentes individuais); **Sinergismo:** (interação positiva ou potencialização); **Antagonismo:** (interação negativa).

[024] **Figura 3-** Gráfico isobolograma mostrando as CIMs combinadas do eugenol com nanopartícula de prata. As linhas azul (*S. aureus* ATCC29213), vermelha (*S. aureus* ATCC25923) e verde (*S. aureus* BEC9393) estão formando uma curva côncava, confirmando o efeito sinérgico.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA E UM ANTIBIÓTICO OBTIDO DE CRAVO-DA-ÍNDIA, caracterizada pelo fato de ser constituída por 0,5 a 1% de 4-alil-2-metoxifenol (eugenol) e 62,5 μM de nanopartículas de prata (obtidas através de *Fusarium oxysporum*);

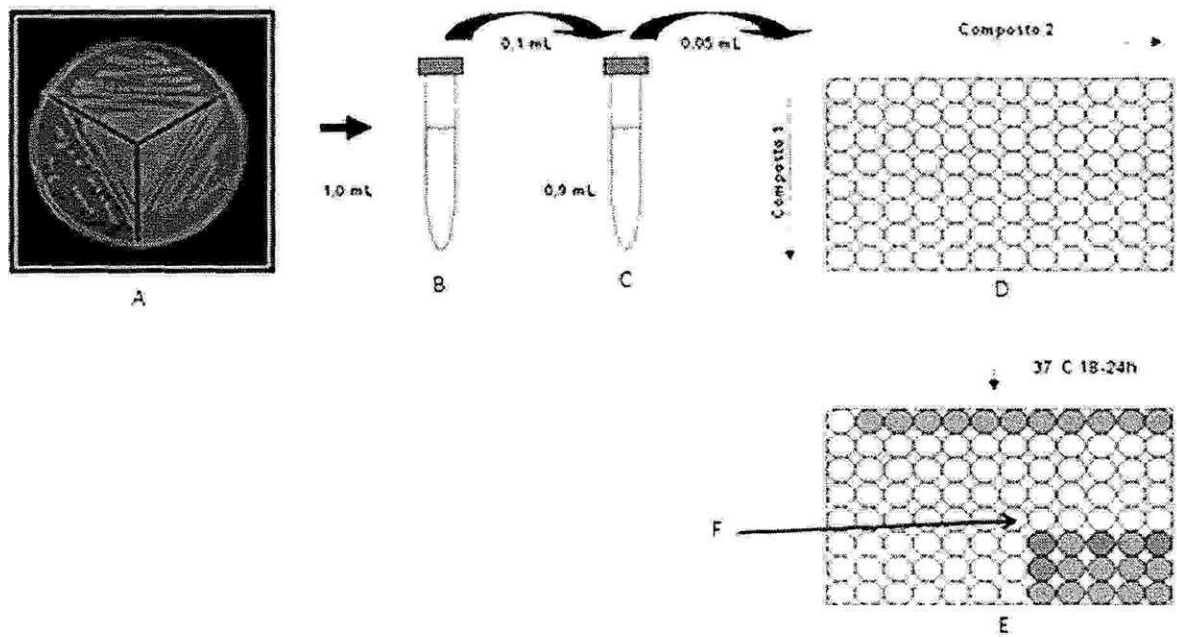
DESENHOS

Fig 1

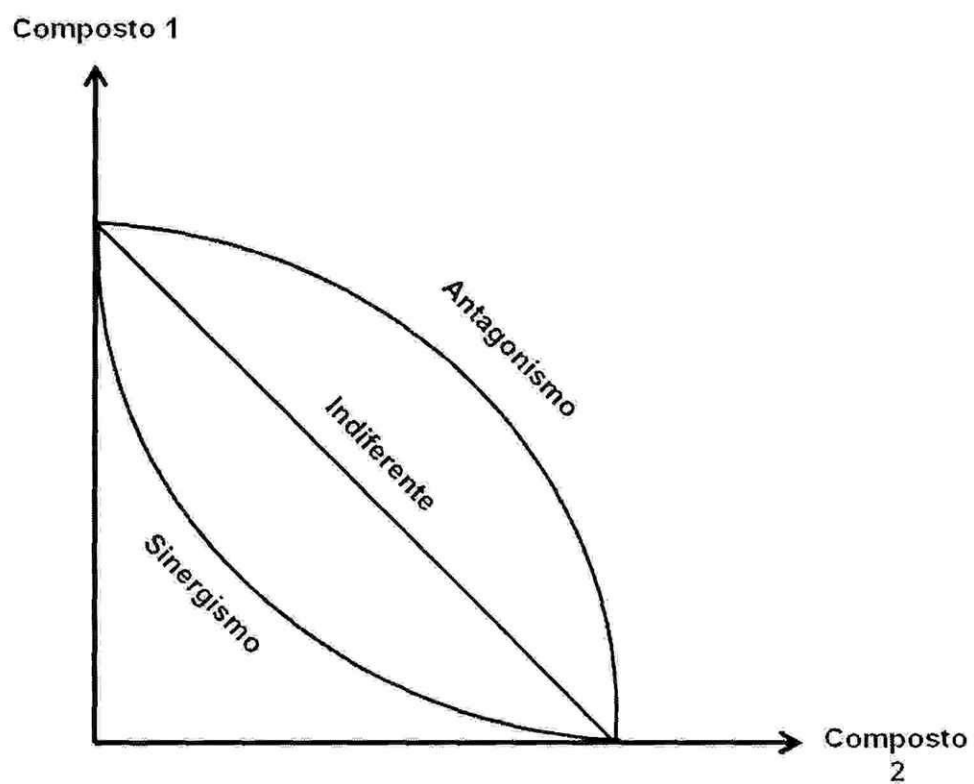


Fig 2

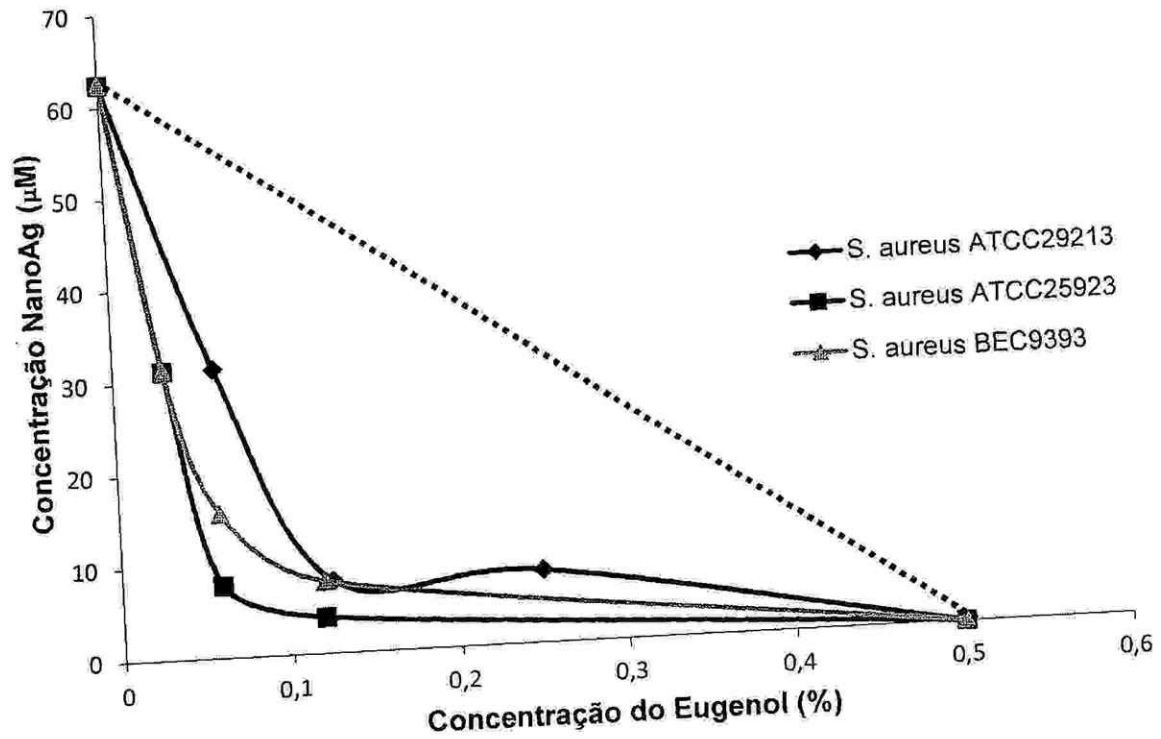


Fig 3