



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021025148-4 A2

(22) Data do Depósito: 15/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
20/06/2023

(54) **Título:** PROCESSO DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS POR NANOPARTÍCULAS DE ZINCO

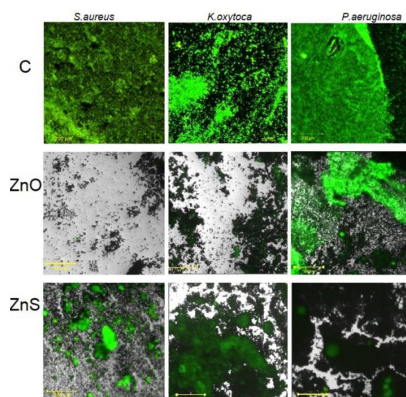
(51) **Int. Cl.:** A01N 25/26; A01N 59/16; A01P 1/00.

(52) **CPC:** A01N 25/26; A01N 59/16; A01P 1/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** RAFAEL BIANCHINI FULINDI; PAULO INÁCIO DA COSTA; JULIANA DOMINGUES RODRIGUES; FELIPE DE ALMEIDA LA PORTA.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS POR NANOPARTÍCULAS DE ZINCO. O presente pedido de patente de invenção refere-se o processo de inibição formação de biofilmes bacterianos por nanopartículas de zinco. O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para revestimento de embalagens de alimentos, canos, tanques, utensílios, cateteres de uso crônico, como utilizados em pacientes na unidade de terapia intensiva, revestimento de superfícies para máquinas que processam alimentos e produtos do gênero alimentício.



PROCESSO DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS POR NANOPARTÍCULAS DE ZINCO.

INTRODUÇÃO

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se o processo de inibição da formação de biofilmes bacterianos por nanopartículas de zinco.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para revestimento de embalagens de alimentos, canos, tanques, utensílios, cateteres de uso crônico, como utilizados em pacientes na unidade de terapia intensiva, revestimento de superfícies para máquinas que processam alimentos e produtos do gênero alimentício.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] As soluções apresentadas atualmente, envolvendo nanopartículas, geralmente utilizam íons metálicos como prata, ouro, ferro e outros. Esses, que possuem uma maior toxicidade do que o ZnS e apresentam problemas após a dissociação molecular com a possível produção de radicais livres e, dependendo da dosagem, apresentar problemas mais sérios aos alimentos, à saúde humana e até mesmo ao meio ambiente (TORTELLA *et al.*, 2019, ao ZnO e KRÓL *et al.*, 2017 às nanopartículas de prata).

[004] Diferente da patente PI 1002653-3 A2, que demonstra a utilização de molibdato metálicos no revestimento de embalagens para alimentos e a Patente WO2013001433 que utiliza nanopartículas de sais de fluoreto, esta patente utiliza uma molécula menos tóxica e com maior potencial de benefícios.

[005] A utilização do ZnS demonstra-se com melhores benefícios principalmente pela sua estrutura e formação (tendo o enxofre na composição) principalmente pela menor citotoxicidade e capacidade do corpo de utilizá-lo em demais funções (co enzimas zinco dependentes). Portanto, como novidade, esta patente traz a utilização do sulfeto de zinco como possível agente de revestimento de superfícies (Aço, poliestireno, polipropileno, acrílico e titânio) de interesse às indústrias que sofrem diariamente com o problema da contaminação e formação de biofilmes bacterianos (Bactérias Gram positivo e negativo).

[006] As soluções apresentadas atualmente, envolvendo nanopartículas, geralmente utilizam íons metálicos como prata, ouro, ferro e outros. Esses, que possuem uma maior toxicidade do que o ZnS e apresentam problemas após a dissociação molecular com a possível produção de radicais livres e, dependendo da dosagem, apresentar problemas mais sérios aos alimentos, à saúde humana e até mesmo ao meio ambiente (TORTELLA *et al.*, 2019, ao ZnO e KRÓL *et al.*, 2017 às nanopartículas de prata).

[007] Diferente da patente PI 1002653-3 A2, que demonstra a utilização de molibdato metálicos no revestimento de embalagens para alimentos e a Patente WO2013001433, que utiliza nanopartículas de sais de fluoreto esta patente utiliza uma molécula menos tóxica e com maior potencial de benefícios.

A utilização do ZnS demonstra-se com melhores benefícios principalmente pela sua estrutura e formação (tendo o enxofre na composição) principalmente pela menor citotoxicidade e capacidade do corpo de utilizá-lo em demais funções (coenzimas zinco dependentes). Portanto, como novidade, esta patente traz a utilização do sulfeto de zinco como possível agente de revestimento de superfícies (Aço, poliestireno, polipropileno, acrílico e titânio) de interesse às indústrias que sofrem diariamente com o problema da contaminação e formação de biofilmes bacterianos (Bactérias Gram positivo e negativo).

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[008] A formação de biofilmes é a capacidade que algumas bactérias têm para sobreviver em condições hostis. Esses biofilmes geram um ambiente que aumenta a resistência antimicrobiana *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca* são exemplos de bactérias capazes de produzir biofilmes. As nanopartículas estão surgindo como novas soluções antimicrobianas devido às suas propriedades sobre bactérias e biofilmes. O objetivo, portanto, é o efeito das nanopartículas, Óxido de Zinco (ZnO) e Sulfeto de Zinco (ZnS), sobre o crescimento bacteriano, Gram positiva *S. aureus* e Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*, e formação de biofilmes. Aplicação das nanopartículas de óxido de zinco e, principalmente as de sulfeto de zinco, apresentaram efeitos inibidores da formação de biofilmes bacterianos, Gram positivas e negativas, a partir de inóculos

contendo 10^5 e 10^3 UFC.mL⁻¹, respectivamente. As concentrações inibitórias e bactericidas das nanopartículas foram respectivamente, 1,0 mg.mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus* e de 4,0 mg.mL⁻¹ para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*. Nas concentrações das nanopartículas correspondentes a 50% de viabilidade os biofilmes demonstraram padrões irregulares de crescimento observados pela microscopia confocal.

[009] Concluindo, estes resultados corroboram para a aplicabilidade de nanopartículas de óxido de zinco e sulfeto de zinco no revestimento de superfícies de recipientes industriais para conservação de alimentos ou em materiais de contato contínuo com epitélios, como sondas ou implantes crônicos; ambos com possibilidade de formação de biofilmes e desenvolvimento de infecções.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[010] Primeiramente, a concentração do inóculo bacteriano foi padronizada. As cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, em 108 UFC.mL⁻¹. Posteriormente foram padronizadas as soluções com as nanopartículas de Zinco. (1000 e 4000 µg.mL⁻¹ para Gram (+) e Gram (-) respectivamente). Esta suspensão foi utilizada para o preparo das concentrações utilizadas.

[011] Desenvolvimento do teste de XTT – Viabilidade celular: O teste de viabilidade celular pelo teste do XTT foi utilizado para a verificação do metabolismo energético das bactérias, expostas ou não às nanopartículas.

[012] Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas sobre a formação de biofilmes em substrato de poliestireno: Os ensaios da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas foram realizados em superfície de poliestireno e a menor concentração inibitória foi determinada de acordo com a CLSI.

[013] Quantificação do biofilme: Teste do Cristal Violeta – TCV: A massa produzida pelo biofilme foi quantificada pela coloração com cristal violeta. Foi realizado o TCV nas placas contendo as bactérias tratadas com as nanopartículas e sem o tratamento.

[014] Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL): A Realização da Microscopia confocal de varredura a laser foi essencial para a visualização dos biofilmes expostos

ou não às nanopartículas e conseqüentemente a sua morfologia quando exposto a diferentes concentrações das nanopartículas. Objetivando-se, com esta técnica, a análise da espessura e da qualidade do biofilme formado.

[015] Microscopia eletrônica de varredura - MEV: Para análise da interação das NPs com as bactérias foi realizado o ensaio de microscopia eletrônica de varredura-MEV para assim observar se os tratamentos com as NPs resultariam: em completa morte das bactérias, ou apenas um descolamento destas da superfície abiótica de acrílico [poli(metil metacrilato)] se haveria uma descaracterização do formato do biofilme; ou se o biofilme permaneceria inalterado estruturalmente.

[016] A Figura 1 apresenta os biofilmes de *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa* de 24h tratados com Nps-Zn obtido por MCVL, colorido com BacLight™ LIVE/DEAD L7007.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[017] A compreensão do conceito de biofilmes microbianos e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição, bem como seu processo de formação são fundamentais para desenvolver estratégias de controles efetivos; além de permitir o entendimento dos riscos que tais estruturas produzem: à indústria de alimentos (corrosão de equipamentos e contaminação de alimentos), aos alimentos e alteração de suas propriedades nutricionais, à toxinfecção alimentar, resistência aos sanitizantes e aos antibióticos, resistência ao sistema imunológico com possibilidade de bacteremia e septicemia, e, portanto, o alto risco à saúde humana e animal.

[018] As bactérias alvo foram selecionadas com base na importância na indústria de alimentos, na contaminação de alimentos decorrentes da manipulação humana e, na área médica, que contribuem para infecções letais em pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles em UTI com intubação orotraqueal e que podem evoluir para pneumonias nosocomiais.

[019] Um estudo recente conduzido pela mestranda Gonçalves, MP da Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2014, verificou a importância da dieta sobre a formação e adesão de biofilmes associados à microbiota bucal, principalmente decorrente de dietas ricas em alimentos ácidos, glicanos e frutanos; mostra também as

implicações sobre a imunidade e o metabolismo. [020] Outro trabalho de revisão publicado pelo grupo da Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli do departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras-MG, Revista do Instituto Adolfo Lutz, SP, 69(3), 2010, discute a importância da matriz exopolissacarídica secretada pelas bactérias produtoras de biofilmes e suas implicações quanto à resistência a ação de anti-microbianos e produtos sanitizantes, podendo causar inativação destes ou mesmo reduzir suas ações. Aliado a esse efeito, observa a corrosão induzida pelos biofilmes microbianos implicando na redução da vida útil desses equipamentos e prejudicando a transferência de calor entre superfícies com redução da qualidade dos produtos.

[021] No início do ano de 2021, o laboratório detentor do presente pedido de patente de invenção, em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Plantas-LBMP do Departamento de Tecnologia da FCAV de Jaboticabal-UNESP, Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, publicou um trabalho sobre a influência de íons bivalentes de cobre (Cu^{2+}) e hexavalentes de cromo (Cr^{6+}) sobre a produção de matriz exopolissacarídica (EPS) e poliidroxibutirato (PHB) pela bactéria *Rhizobium tropici* (Springer Nature – J. Polymers and the Environment, on line, 02 january, 2019, doi:10.1007/s 10924-018-1359-4). Estes EPS possuem inúmeras aplicações como: biofloculantes, anti-oxidantes, antiinflamatório, imunomoduladores, entre outras. Desta forma, o entendimento da produção desta matriz associada a biofilmes microbianos permitirá não somente o controle de sua produção, como é o caso do trabalho do Rafael, como também desenvolver outros modelos de expressão que possibilitem em diferentes aplicações.

[022] Em 2001, Miwa *et al.*, e, em 2008, Chung *et al.*, publicaram no Int. J. Food Microbiol., importantes trabalhos sobre biofilme de *Staphylococcus aureus*, caracterizando este tipo bacteriano como mais comum nos envenenamentos alimentares. Outro importante trabalho que estará publicado em 2020 na LWT-Food Science and Technology, 117, que também trata de biofilme produzido por *S. aureus* e sua importância na indústria de alimentos, principalmente quanto à resistência a sanitização de superfícies. Portanto esta patente traz uma solução quanto a esse

problema, utilizando nanopartículas de zinco como óxido de zinco e, principalmente Sulfeto de Zinco (ZnS).

[023] A utilização do ZnS demonstra-se com melhores benefícios principalmente pela sua estrutura e formação (tendo o enxofre na composição) principalmente pela menor citotoxicidade e capacidade do corpo de utilizá-lo em demais funções (co enzimas zinco dependentes). Portanto, como novidade, esta patente traz a utilização do sulfeto de zinco como possível agente de revestimento de superfícies (Aço, poliestireno, polipropileno, acrílico e titânio) de interesse às indústrias que sofrem diariamente com o problema da contaminação e formação de biofilmes bacterianos (Bactérias Gram positivo e negativo).

REIVINDICAÇÃO

1. PROCESSO DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS POR NANOPARTÍCULAS DE ZINCO, o dito biofilme **caracterizado por** ser formado pela seguinte metodologia que compreende:

1-a concentração do inóculo bacteriano é padronizada; as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182, em 108 UFC.mL^{-1} ; posteriormente, serem padronizadas as soluções com as nanopartículas de Zinco (1000 e $4000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para Gram (+) e Gram (-) respectivamente) e esta suspensão ser utilizada para o preparo das concentrações utilizadas;

2-o desenvolvimento do teste de XTT – Viabilidade celular: o teste de viabilidade celular pelo teste do XTT é utilizado para a verificação do metabolismo energético das bactérias, expostas ou não às nanopartículas;

3-a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas sobre a formação de biofilmes em substrato de poliestireno: os ensaios da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas são realizados em superfície de poliestireno e A menor concentração inibitória foi determinada de acordo com a CLSI;

4-quantificação do biofilme: Teste do Cristal Violeta – TCV: a massa produzida pelo biofilme é quantificada pela coloração com cristal violeta; foi realizado o TCV nas placas contendo as bactérias tratadas com as nanopartículas e sem o tratamento;

4-Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL): a realização da Microscopia confocal de varredura a laser é essencial para a visualização dos biofilmes expostos ou não às nanopartículas e conseqüentemente a sua morfologia quando exposto a diferentes concentrações das nanopartículas; objetivando-se, com esta técnica, a análise da espessura e da qualidade do biofilme formado;

5-Microscopia eletrônica de varredura - MEV: Para análise da interação das NPs com as bactérias é realizado o ensaio de microscopia eletrônica de varredura-MEV para assim observar se os tratamentos com as NPs resultariam: em completa morte das bactérias, ou apenas um descolamento destas da superfície abiótica de acrílico

[poli(metil metacrilato)] se haveria uma descaracterização do formato do biofilme; ou se o biofilme permaneceria inalterado estruturalmente.

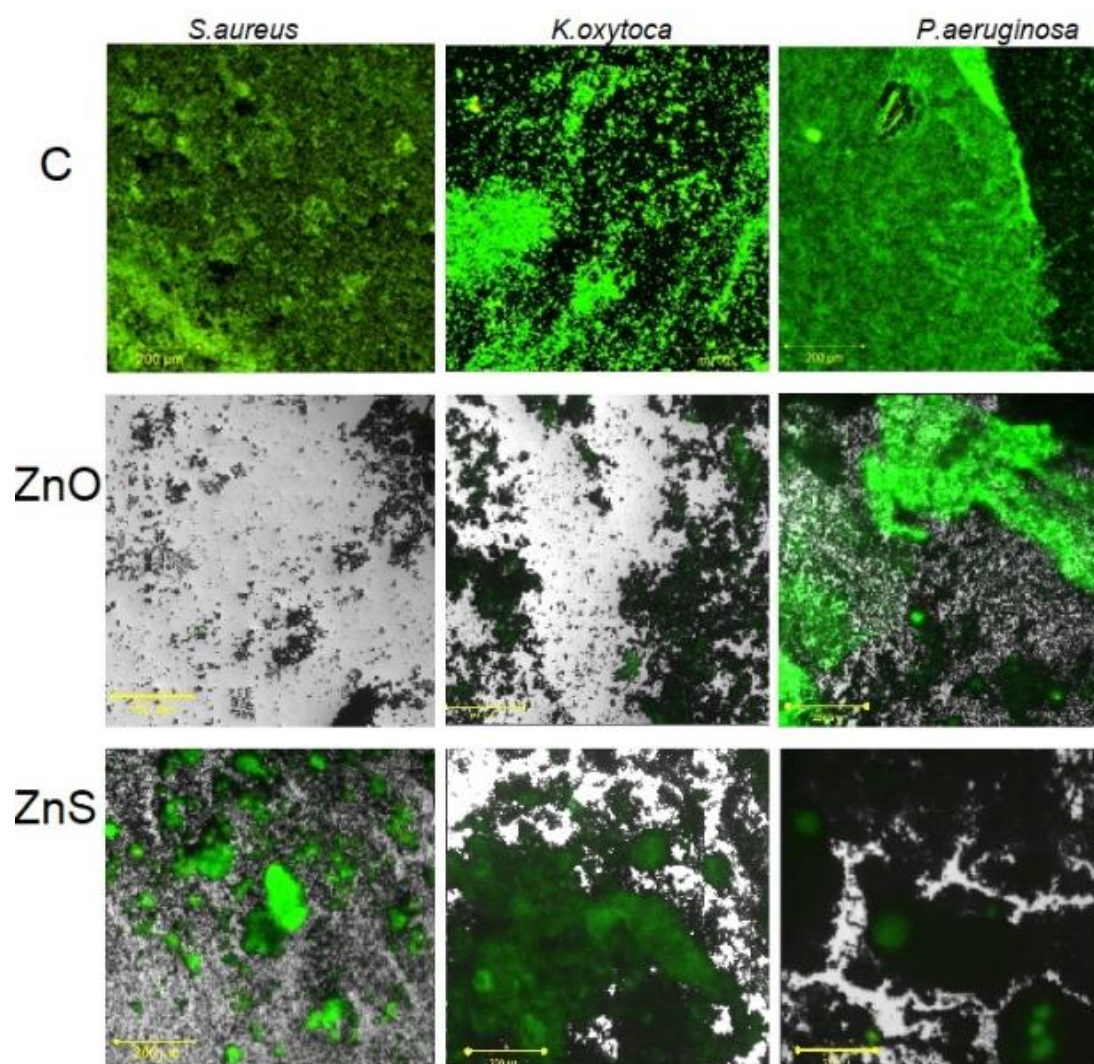


FIGURA 1

RESUMO

PROCESSO DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS POR NANOPARTÍCULAS DE ZINCO.

O presente pedido de patente de invenção refere-se o processo de inibição formação de biofilmes bacterianos por nanopartículas de zinco. O presente pedido de patente de invenção pode ser aplicado para revestimento de embalagens de alimentos, canos, tanques, utensílios, cateteres de uso crônico, como utilizados em pacientes na unidade de terapia intensiva, revestimento de superfícies para máquinas que processam alimentos e produtos do gênero alimentício.