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

(21) BR 102019014838-1 A2

(22) Data do Depósito: 18/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

(54) Título: RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA

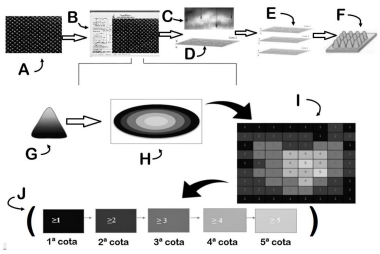
(51) Int. Cl.: A01N 59/16; A01N 25/34; A01N 25/28; A01N 25/10; A01P 1/00.

(52) CPC: A01N 59/16; A01N 25/34; A01N 25/28; A01N 25/10.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): PETRUS D'AMORIM SANTA CRUZ OLIVEIRA; NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES; LIZETH ALEJANDRA GUERRERO ZAMBRANO; ELIBE SILVA SOUZA; ROSELY MAIER-QUEIROZ.

(57) Resumo: RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA . Refere-se a presente invenção a um recobrimento funcional híbrido caracterizado por atuar como dispositivo antibacteriano imprimível que alia parte biologicamente ativa, composta de nanoestruturas metálicas contidas em fluido de impressão, com parte passiva, formada por microtextura impressa a partir do mesmo fluido, jateado por impressora de materiais, tipicamente com atuadores piezoelétricos, utilizando padrões digitais preparados por micrografias, tipicamente AFM, resultando em padrão microestruturado capaz de inibir a formação de placas por impedir a fixação das bactérias sobreviventes sobre a superfície em que atua. Assim, o dispositivo apresenta estruturas hierárquicas micro/nano, em que o material bioativo (nanopartículas metálicas) encontra-se em escala nanométrica ativa, enquanto uma estrutura micrométrica passiva impõe caráter antibioadesivo. Numa primeira etapa de atuação, tipicamente em meio aquoso, há efeito bactericida do material nanoestruturado bioativo, e numa segunda etapa, a microestrutura passiva contribui para evitar a formação de biofilme com bactérias eventualmente sobreviventes por serem mais resistentes, reduzindo propagação de genes associados a esta resistência e processo evolutivo nessas bactérias.



RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA

01. Refere-se a presente invenção a um recobrimento funcional híbrido caracterizado por atuar como dispositivo antibacteriano imprimível que alia parte biologicamente ativa, composta de nanoestruturas metálicas contidas no fluido de impressão, com parte passiva, formada por microtextura impressa a partir do mesmo fluido, capaz de inibir a formação de placas por impedir a fixação das bactérias sobreviventes sobre a superfície em que atua.

02. Fazendo-se uma analogia *lato sensu* à pele, considerado o maior órgão do corpo humano, estruturado para desempenhar várias funções, o dispositivo aqui proposto é um recobrimento funcional estruturado, que deve se estender a toda superfície em que se pretende que atue, aplicado por técnicas de impressão de materiais funcionais. O que caracteriza a presente invenção é a atividade passiva da estrutura em um segundo tempo no mecanismo proposto, impedindo a formação de placa bacteriana por indivíduos eventualmente mais resistentes e não afetados numa primeira etapa do mecanismo, pela ação bactericida da composição do mesmo recobrimento impresso.

03. Um dos maiores desafios das próximas décadas para a manutenção da saúde de populações está no controle da proliferação de bactérias e de superbactérias oriundas de pressão seletiva associada ao uso indiscriminado de antibióticos. Faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas que reduzam a propagação das bactérias mais resistentes, evitando a geração de cepas com genes associados a esta resistência. Um dispositivo que alie etapas passivas que impeçam esta proliferação pode ser uma alternativa que alie menor contaminação ambiental e baixo custo ao controle bacteriano.

04. O estado da técnica inclui muitas aplicações que exploram atividades antibacterianas de nanopartículas metálicas em meios ativos, tipicamente de prata para liberação de íons Ag^+ em meio aquoso, que atuam sobre as bactérias através de pelo menos três mecanismos conhecidos, no entanto, não há relatos de dispositivos que associem a atividade bactericida ativa a estruturas passivas que aliem essas atividades a

ações inibitórias de formação de biofilme que não sejam passíveis de atenuação por meio de evolução das espécies por pressão seletiva.

05. A presente invenção tem como principal objetivo o aumento da eficiência de recobrimentos antibacterianos sem aumento de custo, através da impressão dos meios bioativos na forma de microestruturas que passivamente dificultem a adesão celular, através da exploração da geometria dos padrões impressos, impondo passivamente ângulos de contato inapropriados para a formação de biofilmes. O baixo custo está relacionado ao fato de o material passivo impresso ser constituído da própria parte bioativa, apenas apresentado nova morfologia, imposta por moldes que induzam dificultar a adesão bacteriana.

06. Da mesma forma que em bactérias expostas a antibióticos, já se constata o surgimento de mecanismos de defesa em bactérias expostas a nanopartículas metálicas, que em algumas gerações aumentam a produção de flagelina, proteína estrutural que induz a aglomeração das nanopartículas e consequente redução de atividade antibacteriana. A proposta desses materiais bioativos serem apresentados na forma de superfícies passivas com morfologia desfavorável à formação de placa bacteriana tem como objetivo impedir que bactérias mais resistentes que eventualmente sobrevivam à ação bactericida do material, sejam portadoras de genes associados a esta resistência nas gerações seguintes, dificultando sua fixação na forma de comunidades estruturadas.

07. O dispositivo imprimível aqui proposto é projetado em duas etapas, sendo a parte bioativa um fluido polimérico contendo nanopartículas metálicas (prata, ouro, cobre, platina), tipicamente prata, com diâmetros entre 2 e 500 nm (tipicamente entre 30 e 100 nm) impresso na forma de microtextura, identificada aqui como etapa da parte passiva, cujo padrão deve ser definido através de moldes que resultem em redução de ângulo de contato entre a bactéria e o substrato (material a ser recoberto), dificultando a adesão e reduzindo formação de biofilme. Apesar da diferenciação de parte ativa e passiva no dispositivo, trata-se de um único material, que alia às nanoestruturas uma morfologia de superfície ao recobrimento que as contêm, projetada para atuar impedindo a formação de biofilmes que proliferem as bactérias eventualmente mais resistentes, que sobreviveram à parte bioativa.

08. A morfologia da superfície do recobrimento é inserida utilizando-se moldes digitais para impressão do fluido bioativo composto das nanopartículas metálicas dispersas em fase polimérica, fotopolimerizável (tipicamente por radiação UV ou luz azul) através de fotoinicializador, ou por cura através de evaporação de solvente.

09. Utiliza-se impressora de jato de materiais, tipicamente tipo "drop-on-demand", por exemplo com atuadores piezoelétricos, como impressoras tipo Dimatix da série 2800, ejetando gotas de volume a partir de 1 pL, ou impressora tipo SIJ (Superfine Inkjet), ejetando gotas menores que 1fL (10^{-15} litros), e resolução submicrométrica. Neste primeiro caso, os moldes digitais podem ser produzidos com ferramentas de CAD 3D, ou preparados através de imagens de microscopia, tipicamente de força atômica (AFM), para biomimetização de estruturas naturais, tipicamente superfícies de folhas com superfícies super-hidrofóbicas, ou mesmo de animais (superfícies de asas de alguns insetos, p.ex.). Microscopias desses "biomoldes" podem ser utilizadas para gerar os moldes digitais, por exemplo com o uso do programa de computador TopoSlicer (registro INPI BR512018001308-2), e utilizados em seguida para impressão do fluido bioativo.

10. As estruturas impressas devem resultar em superfícies antibioadesivas através do monitoramento de super-hidrofobicidade resultante da geometria e tamanho das estruturas contidas nos padrões impressos em função do tamanho e forma das bactérias que se pretende evitar a adesão, podendo-se utilizar modelos baseados em estados metaestáveis de Casie-Baxter, em que não há penetração de interface aquosa entre as estruturas impressas que ficarão em contato com as bactérias, ou estados de Wenzel, em que há interface aquosa que penetra ente as microestruturas do recobrimento impresso.

11. Os recobrimentos assim produzidos constituem dispositivo híbrido que possui vantagens como o baixo custo de produção, por utilizaram o mesmo material bioativo bactericida, mas aliando a este uma textura que resulta em melhor eficiência antibacteriana.

12. Uma das principais novidades que caracterizam a invenção consiste principalmente na resistência à redução da atividade antibacteriana por adaptação evolutiva das espécies envolvidas, já que se trata de uma ação passiva associada à

estrutura morfológica adicionada ao material, resultando em maior longevidade do processo proposto do que um recobrimento impresso liso do mesmo material bioativo, que induz pressão evolutiva.

13. Os fluidos bioativos podem conter nanopartículas metálicas oriundas dos mais diversos processos, e a título de exemplo, duas rotas de preparação são apresentadas. A primeira, utilizando síntese química tendo $AgNO_3$ como precursor (tipicamente ~1 mM, 10 mL), adicionando-se gota a gota (tipicamente ~1 gota/s) a uma solução de $NaBH_4$ sob agitação contínua (tipicamente ~3 mM, 25 ml). Em seguida, $C_6H_5Na_3O_7$ (tipicamente 0,05 M, 5mL) e polivinilpirrolidona - PVP (tipicamente 200 uL, 3% w/v) foram adicionados na mesma taxa, obtendo-se uma solução estável de nanopartículas. O segundo exemplo de rota é uma síntese utilizando micro-ondas, também tendo $AgNO_3$ como precursor (tipicamente ~4 mM, 1 mL), adicionado a N,N-dimethylformamide - DMF (tipicamente ~5 mL) e PVP (tipicamente 200 uL, 3% w/v), com mistura submetida a um reator de micro-ondas (150 W) por 30 s, sob agitação a 90º C e 250 PSI, obtendo-se as nanopartículas. Em ambos os casos as soluções foram filtradas após centrifugação (tipicamente 10 min a 10000 rpm) e secadas a 60º C, apresentando nanopartículas com distribuição de tamanhos entre ~30 nm e ~60 nm.

14. Para a preparação dos fluidos imprimíveis, as nanopartículas metálicas são adicionadas a soluções poliméricas contendo solventes voláteis. A natureza do polímero e do solvente deve ocorrer em função do tipo de substrato que se pretende recobrir, e o fluido deve ser ajustado (viscosidade, tensão superficial, volatilidade) em função dos parâmetros de microfluídica, compatíveis com os bicos de impressão utilizados, otimizando-se a forma de onda do pulso elétrico aplicado aos piezoelétricos para ejeção das gotas, com monitoramento a partir de câmeras estroboscópicas embarcadas na impressora. Parâmetros como os números de Ohnesorge (Oh), Reynolds (Re) e Weber (We) são monitorados para obtenção de um fluido bioativo imprimível. A título de exemplo, pode-se utilizar polímeros como polivinil butiral (PVB) e poliácido lático (PLA), com solventes como etanol, tolueno, ou outro, em função do polímero e do substrato a ser recoberto. As nanopartículas metálicas devem ser sonicadas com a

solução polimérica para melhor dispersão, e em seguida inseridas no cartucho para alimentar os bicos de impressão.

15. Para impressão do fluido na forma de recobrimento com a superfície microtexturizada, o padrão de impressão deve ser definido em função do tamanho da bactéria, que resulte na redução de adesão, evitando formação de biofilme. Para tal, devem ser impressos padrões de estruturas e dimensões típicas das dimensões das bactérias - tipicamente em torno de 1.5 μm para E. Coli, por exemplo. A microsestrutura tridimensional do recobrimento impresso é obtida a partir de impressão *Drop on Demand* (*DoD*) camada por camada (*LbL*), por substituição dos moldes digitais em função da cota de nível (altura) da camada. Esse conjunto de moldes pode ser obtido através do programa TopoSlicer (registro INPI BR512018001308-2) que faz o fatiamento de imagens bidimensionais de microscopia (tipicamente de força atômica, AFM), em função do nível de cinza associado à cota (geralmente eixo z da estrutura) na micrografia, tipicamente tons mais claros à medida em que a cota aumenta, fazendo também a colagem de mosaicos para cobrir a área a ser impressa por cada molde digital.

16. A figura 1 mostra o esquema gráfico da produção do recobrimento híbrido a partir da impressão de fluido bioativo, depositado camada por camada, utilizando-se uma sequência de moldes digitais gerados, por exemplo, a partir de micrografia 2D (tipicamente obtida por AFM) de uma superfície natural (biomolde) ou sintética, que alie propriedade antibioadesiva à propriedade bactericida do fluido.

17. A micrografia, mostrada na figura 1(A), é utilizada como entrada em programa como o TopoSlicer, mostrado na figura 1(B), que através de fatiamento em função dos níveis de cinza, gera um conjunto de moldes digitais, utilizados para determinar as coordenadas do jateamento de gotas em impressora de materiais. As gotas do material bioativo, mostradas na imagem 1(C), foram registradas por câmera estroboscópica embarcada na impressora para otimização da impressão. Essas gotas, que podem ter diâmetros submicrométicos), são ejetadas no substrato em que se pretende aplicar o recobrimento híbrido, nas coordenadas da camada a ser impressa, como mostrado na figura 1(D). O molde digital é previamente redimensionado pelo programa para se ajustar ao tamanho do substrato através da formação de mosaico. O

processo de impressão é repetido camada por camada, trocando-se o molde digital em função da altura (cota), como mostrado na figura 1(E), resultando no final da sequência, no recobrimento híbrido impresso com microtextura antibioadesiva de material bioativo, representado na figura 1(F).

18. O programa mostrado na figura 1(B) atua da seguinte forma: As microestruturas tridimensionais a serem impressas, com unidade representada pela figura 1(G), aparecem nas micrografia bidimensional em níveis de cinza, com vista do topo representada na figura 1(H), em que as coordenadas (x,y,z) aparecem como pontos (x,y, nível de cinza), representados na figura 1(I) como pixeis (x, y, C). O parâmetro C, associado ao nível de cinza do pixel, indicará em até qual camada (cota) haverá jateamento da gota de material bioativo em cada coordenada.

19. Para ajuste da micrografia ao tamanho do substrato, o programa monta uma imagem maior, formada de um mosaico de micrografias, antes da geração do conjunto de moldes digitais mostrados na figura 1(J), a serem impressos em sequência, camada por camada, no tamanho adequado.

20. Para a geração deste conjunto de moldes digitais, mostrado na figura 1(J), o algoritmo utilizado fará com que o cada pixel (x, y, C) seja impresso com jateamento de gota do material bioativo apenas nas coordenadas (x, y) das camadas (cotas) com valores iguais ou maiores que C, sabendo-se que este valor é associado ao nível de cinza, e consequentemente à cota nas micrografias de AFM. Para evitar um número grande de troca de moldes, pode-se repetir o mesmo molde por um número predeterminado de cotas, mas para simplificar, estabelecemos aqui que cada nível de cinza corresponde a uma cota (camada a ser impressa). Desta forma, o primeiro molde digital (primeira cota, C=1) resultará no recobrimento de toda a superfície, pois qualquer ponto terá valor de C maior ou igual a 1, enquanto que o último molde digital resultará no jateamento apenas nas coordenadas dos pixeis marcados com o maior valor, neste exemplo, C=5, correspondendo às áreas mais claras da micrografia.

21. O recobrimento estará pronto para ser exposto para uso após cura do material polimérico, ou através da evaporação de parte volátil (solvente) do fluido imprimível,

ou através de fotopolimerização, para fluidos contendo fotoiniciadores com papel de absorver a radiação (tipicamente UV) para produção de radicais livres necessários para a polimerização.

22. O produto final representado pela figura 1(F), é um recobrimento apresentando estruturas hierárquicas micro/nano, em que o material bioativo (nanopartículas metálicas) encontra-se em escala nanométrica ativa, enquanto uma estrutura micrométrica passiva impõe caráter antibioadesivo. Numa primeira etapa, há efeito bactericida do material nanoestruturado bioativo, tipicamente em meio aquoso, e numa segunda etapa, a microestrutura passiva contribui para evitar a formação de biofilme com bactérias sobreviventes, eventualmente mais resistentes, reduzindo propagação de genes associados a esta resistência e processo evolutivo nessas bactérias.

REIVINDICAÇÕES

1. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, caracterizado por atuar como dispositivo antibacteriano produzido por fluido imprimível bioativo contendo nanopartículas metálicas jateadas a partir de moldes digitais.

2. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por aliar uma microtextura a este recobrimento, que passivamente contribui com a inibição de formação de placa bacteriana, graças a padrões morfologicamente adequados, resultando em dispositivo híbrido que atua simultaneamente de forma bactericida e inibidora de placa.

3. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por utilizar moldes digitais produzidos a partir da mimetização de estruturas de superfícies biológicas animais ou vegetais, a partir de fatiamento de micrografias de microscopia de força atômica (AFM) para impressão camada por camada de fluido bioativo, com diferentes moldes digitais definidos pelos níveis de cinza das imagens, conforme mostrado no esquema gráfico da figura 1.

4. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com as reivindicações 2 e 3, caracterizado por apresentar estruturas hierárquicas nano- e micrométricas, sendo a primeira estrutura hierárquica constituída de nanopartículas metálicas bioativas, e a segunda estrutura hierárquica, constituída de microestruturas formadas pelo material polimérico que contém a primeira, aliando novas propriedades antibioadesivas às propriedades antibacterianas do material que a constitui.

5. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por impedir a formação de biofilme com eventuais bactérias sobreviventes de ação bactericida do fluido, contribuindo com a redução da pressão evolutiva que levaria à propagação de genes associados a esta maior resistência.

6. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por permitir se definir o padrão a ser impresso em hierarquia de estrutura micrométrica em função da dimensão e forma da bactéria a qual o dispositivo será exposto, com o mesmo material apresentando nanoestrutura bioativa.

7. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por permitir uso de nanopartículas metálicas produzidas por qualquer rota, tipicamente de prata, ouro, cobre ou platina, com diâmetros entre 2 e 500 nm, dispersas em fluido polimérico imprimível.

8. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por apresentar aditivos no fluido imprimível para polimerização por evaporação de solventes, ou fotoiniciadores, para fotopolimerização do fluido, em processos pós-impressão.

9. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por permitir aplicação em substrato de qualquer material, bastando para isso se escolher polímeros e solventes compatíveis.

10. RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA, de acordo com as reivindicações 3 e 9, caracterizado por permitir aplicação em substrato de tamanhos variados, a partir da construção moldes digitais com dimensões estabelecidas através da formação de mosaicos constituídos das micrografias AFM com os padrões da microtextura desejada.

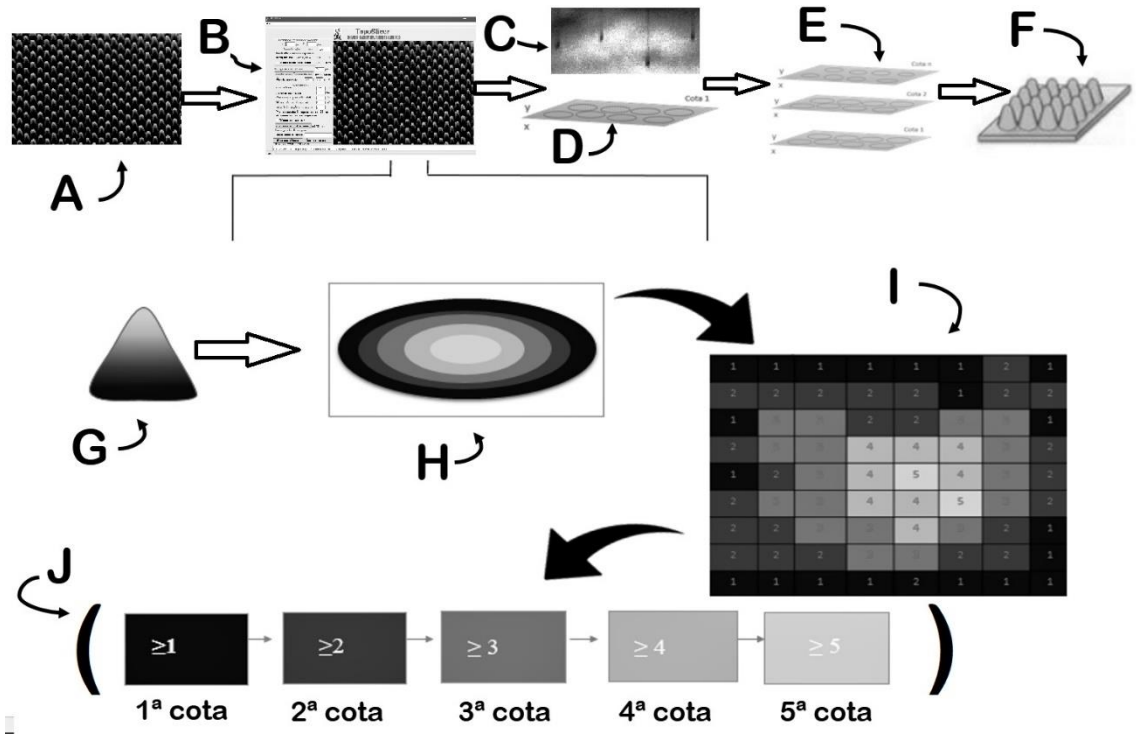


Fig. 1

RESUMO

RECOBRIMENTO IMPRIMÍVEL HÍBRIDO DE MATERIAL BIOATIVO COM INIBIÇÃO ESTRUTURAL DE FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA.

Refere-se a presente invenção a um recobrimento funcional híbrido caracterizado por atuar como dispositivo antibacteriano imprimível que alia parte biologicamente ativa, composta de nanoestruturas metálicas contidas em fluido de impressão, com parte passiva, formada por microtextura impressa a partir do mesmo fluido, jateado por impressora de materiais, tipicamente com atuadores piezoelétricos, utilizando padrões digitais preparados por micrografias, tipicamente AFM, resultando em padrão microestruturado capaz de inibir a formação de placas por impedir a fixação das bactérias sobreviventes sobre a superfície em que atua. Assim, o dispositivo apresenta estruturas hierárquicas micro/nano, em que o material bioativo (nanopartículas metálicas) encontra-se em escala nanométrica ativa, enquanto uma estrutura micrométrica passiva impõe caráter antibioadesivo. Numa primeira etapa de atuação, tipicamente em meio aquoso, há efeito bactericida do material nanoestruturado bioativo, e numa segunda etapa, a microestrutura passiva contribui para evitar a formação de biofilme com bactérias eventualmente sobreviventes por serem mais resistentes, reduzindo propagação de genes associados a esta resistência e processo evolutivo nessas bactérias.