



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021025710-5 A2

(22) Data do Depósito: 18/12/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
27/06/2023

(54) Título: SPRAY NANOESTRUTURADO DE NPSAG-ALGINATO@(EDC/NHS) CONJUGADO, POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS E KLEBSIELLA PNEUMONIAE

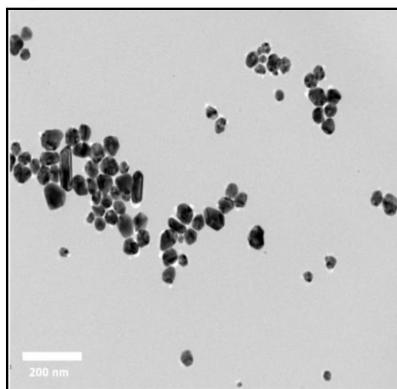
(51) Int. Cl.: A01N 59/16; A01N 25/34; A01N 25/28; A01P 1/00.

(52) CPC: A01N 59/16; A01N 25/34; A01N 25/28; A01P 1/00.

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

(72) Inventor(es): EDUARDO PADRÓN HERNÁNDEZ; SEVERINO ALVES JUNIOR; GLÁUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA; ROBERTA CLÁUDIA SANTOS NEVES; AMANDA MARIA DA SILVA.

(57) Resumo: SPRAY NANOESTRUTURADO DE NPsAg-ALGINATO@(EDC/NHS) CONJUGADO, POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A Staphylococcus aureus E Klebsiella pneumoniae. É divulgado nesta patente de invenção um Spray Nanoestruturado formado por hidrogel de alginato de sódio conjugado com agentes de acoplamento (EDC/NHS), associados com nanopartículas de prata, (NPsAgalginato@(EDC/NHS), a ser utilizado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O spray nanoestruturado apresentou atividade frente as bactérias Gram-positivas (Staphylococcus aureus) e Gram-negativas (Klebsiella pneumoniae).



SPRAY NANOESTRUTURADO DE NPsAg-ALGINATO@(EDC/NHS) CONJUGADO, POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A *Staphylococcus aureus* E *Klebsiella pneumoniae*.

01. A presente patente de invenção reporta a obtenção de um spray nanoestruturado conjugado a partir do hidrogel de alginato, EDC e NHS associado com nanopartículas de prata, NPsAg-alginato@(EDC/NHS), apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* E *Klebsiella pneumoniae*.

02. O aumento da incidência de resistência de micro-organismos aos antibióticos convencionais é um problema significativo em escala global.

03. Além dessa problemática, as doenças transmitidas pelo ar mais comuns, como resfriados ou influenza, são causadas por bactérias e vírus patogênicos no ar, incluindo também doenças mais graves como, a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) até a mais atual de COVID-19 causada pelo novo Coronavírus SARS-CoV-2.

04. Apesar do grande avanço da tecnologia, recentemente diversos agentes infecciosos são encontrados em ambientes hospitalares. Essas infecções contribuem para a morbidade, mortalidade, além de aumentarem o tempo de hospitalização do paciente, elevando os custos hospitalares e do próprio paciente.

05. Sedo assim, faz-se necessário uma exploração em plataformas e materiais nanoestruturados à base de nanopartículas metálicas associadas a redes tridimensionais poliméricas, devido às propriedades potências terapêuticas inerentes, tais como a de agentes antimicrobianos e antivirais, assim como, à grande propagação do vírus SARS-CoV-2.

06. A nanotecnologia é considerada uma importante tecnologia que pode ser utilizada na obtenção de promissores nanomateriais, incluindo as nanopartículas de prata para variados fins.

07. Dentre eles o potencial antimicrobiano e antiviral tem sido objetivo de muitos trabalhos. Neles tem sido mostrada a obtenção de formulações eficazes para prevenir e tratar infecções causadas por micro-organismo, tais como bactérias, fungos e vírus em estágios iniciais, incluindo dentre estes o SARS-CoV-2.

08. As Nanopartículas de Prata (NPsAg) é considerada um grande agente antimicrobiano e antiviral, têm atraído cada vez mais atenção na área biológica e aplicações médicas. O processo de síntese é fácil, sendo considerados bons agentes terapêuticos, biomédicos e curativos para feridas. Além disso, com intuito de serem comercialmente acessíveis, servem como dispositivos médicos, desodorantes sprays, para loções antibacterianas e para produtos para antieimaduras de longo prazo.

09. Há um grande interesse de estudos das nanopartículas de prata incorporadas aos hidrogéis com intuito de obter melhores propriedades, uma vez que, consistem em redes reticuladas de polímeros 3-D hidrofílicos, cercada por uma grande quantidade de água.

10. Hidrogéis a base de alginato de sódio, é uma classe de materiais que consistem em cadeias poliméricas hidrofílicas interpenetrantes, capazes de acumular grandes quantidades de água ou fluidos biológicos, considerados como um bom transportador para agentes antibacterianos.

11. Sabe-se que também que o Alginato de sódio é amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas, alimentos, bebidas e bioengenharia devido à sua biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e baixo custo.

12. Além das pesquisas envolvendo alginato de sódio, a reticulação covalente de alginatos produz matrizes com boas propriedades mecânicas, alguns agentes químicos de acoplamento como o EDC/NHS podem ser utilizados em síntese de alginatos. Isso é possível através da ativação do grupo ácido carboxílico presente no biopolímero criando redes poliméricas mais estáveis.

13. Sendo assim, uma estratégia para potencializar a atividade antimicrobiana do spray nanoestruturado foi a partir da síntese do hidrogel de alginato de sódio conjugado com os agentes de acoplamento (EDC/NHS) e associados com as nanopartículas metálicas de prata (NPsAg), utilizadas no nosso protótipo.

14. Dessa forma, sendo promissores e eficazes para ser aplicado em superfície de contato e em equipamentos de proteção individual (EPIs) e ampliar suas aplicações em hospitais de rede pública.

15. Desta forma, a presente patente de invenção propõe utilizar o spray nanoestruturado de NPsAg-Alginato conjugado, como potencial antimicrobiano possuindo atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, previamente apresentadas.

16. A obtenção do spray nanoestruturado ocorreu em três etapas.

17. Na primeira etapa, foi realizada a obtenção das nanopartículas de prata. As nanopartículas de prata foram obtidas via método de Lee e Meisel e modificações. Inicialmente, a solução de AgNO_3 (Sigma Aldrich), com concentração de 1mM e 5mM, foi aquecida até a ebulição, sendo adicionado à mesma 300 μL de uma solução a 1% de polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma Aldrich), em seguida 5mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Sigma Aldrich), solução a 1%, na proporção de uma gota por segundo; a solução foi mantida em ebulição até a formação de uma coloração amarelo pálido, a qual é indicativa da formação das nanopartículas. A suspensão obtida foi mantida sobre a chapa de aquecimento após seu desligamento, por cerca de um minuto, até que a solução atingisse a cor amarelo pálido; em seguida, a mesma foi arrefecida lentamente, sob agitação, em um banho à temperatura de 20-25°C, até a temperatura ambiente.

18. Na segunda etapa, foi obtido o hidrogel conjugado de alginato, o qual foi baseado na metodologia descrita por Rassu *et al* e Fan *et al*, com as seguintes modificações. O hidrogel conjugado foi obtido inicialmente, a partir de massas dos reagentes de alginato de sódio (Sigma Aldrich), EDC (Sigma Aldrich) e NHS (Sigma Aldrich), em um béquer, uma relação (m/v), foi feita a partir de uma proporção de (100:5:1,5), em seguida a esta mistura foi adicionada à água milli-Q, sob agitação vigorosa, com o auxílio de um agitador magnético, com aquecimento a 40°C, conforme apresenta o mecanismo da reação em duas etapas no esquema da Figura 1.

19. A terceira etapa foi feita para obter hidrogel conjugado associados às NPsAg e obtiveram-se diferentes razões entre a relação (massa/volume) do alginato@(EDC/NHS) e as nanopartículas de prata de 1mM, a estequiometria das sínteses foram ajustadas para determinar a estequiometria ideal entre nanopartículas de prata, o alginato de sódio e os reagentes orgânicos de acoplamento (EDC/NHS), através de volumes diferentes das soluções coloidal de NPsAg-1mM, concentração diferentes de massa do Alginato, EDC e NHS (Tabela 1). As NPsAg decoraram a superfície da rede polimérica do alginato conjugado. A síntese ficou sob agitação vigorosa por 3 horas, com o auxílio de um agitador magnético com aquecimento a temperatura a 40°C.

Tabela 1- Quantidade dos reagentes em (mg) e volumes (mL) para obtenção do Spray Nanoestruturado.

Spray Nanoestruturado	Alginato de sódio (mg)	EDC (mg)	NHS (mg)	NPsAg-1mM (mL)	Água Milli-Q (mL)
S-1	200	10	3	5	5
S-2	200	10	3	1	9
S-3	100	5	1,5	3	7
S-4	100	5	1,5	2	8
S-5	200	10	3	7	3

20. Posteriormente à obtenção da síntese inicial do Spray Nanoestruturado de NPsAg-Alginato@(EDC/NHS) conjugado, foi feita uma análise de 7 dias de síntese, selecionamos as amostras S-3 e S-4, devido uma boa estabilidade.

21. Após obtenção do Spray Nanoestruturados, foram realizados os testes de atividade antimicrobiana contra os micro-organismos selecionados e utilizando as amostras de S-3-5 mM e S-3-5mM-ETOH.

22. A ação antimicrobiana do spray nanoestruturado foi determinada 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 foram realizados em placas de 96 poços, partindo da concentração de 1000 µg/mL no primeiro poço e realizando diluições sucessivas nos demais (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,625 µg/mL; 7,81 µg/mL; 3,9 µg/mL). Os ensaios foram realizados utilizando suspensões dos micro-organismos na concentração de 10^5 UFC/mL. O spray obtido foi testado frente aos microrganismos presentes na microbiota humana, os quais foram: *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) e *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02).

23. Os experimentos para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório Coleção de Microrganismos (UFPEDA), da Universidade Federal de Pernambuco. Sendo determinada a concentração inibitória (CMI), ou concentração mínima, capaz de inibir o crescimento, ou desenvolvimento, do microrganismo, quando exposto ao mesmo, assim como a concentração mínima bactericida (CMB).

24. Os espectros na região do UV-Vis-NIR foram obtidos com o espectrofotômetro UV-Vis-NIR de alto desempenho com excelente desempenho fotométrico, modelo Cary 5000 e operando na faixa de (175-3300 nm). As medidas de Potencial Zeta (ζ) e o tamanho diâmetro hidrodinâmico médio (DLS) das nanopartículas e do spray nanoestruturado foram realizadas utilizando o equipamento NanoBrook Omni particle Analyzer da Brookhaven Instruments. O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido usando o espectrofotômetro com transformada de Fourier da Perkin Elmer (modelo: Spectrum 400, N° de série: 82287) na região entre 4000 e 400 cm^{-1} . Os padrões de difração foram medidos em difratômetro de raios-X Smartlab, X-Ray Diffractometer, com passo de $0,02^\circ$, tempo de aquisição de 1 segundo e janela angular de 0° - 60° . A morfologia de NPsAg, foi analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As amostras de NPsAg foram obtidas usando um microscópio eletrônico da marca termo-científico Jeol, JEM-2100, com voltagem de 200 kV. As medidas reológicas foram realizadas em um Reômetro de tensão controlada (model DHR da TA *Instruments*, $T = 25^\circ\text{C}$, *software* - MCR 301 da Anton Paar Physica), com geometria placa-placa, (50 mm diâmetro) e gap de 0,7 mm. As medidas reológicas dinâmicas oscilatórias foram realizado no modo de varredura de frequência, em que a tensão (τ) aplicada foi constante a (4 Pa) e frequência de oscilação (ω) variou de 6 a 200 Hz, na escala logarítmica de base10 e temperatura constante de 25°C .

25. A seguir, será apresentado o detalhamento das evidências para a presente patente de invenção.

26. A absorção na região do UV-Vis-NIR, indicou para as amostras S-3 e S-4 uma única banda de absorção máxima, característica das nanopartículas de prata esféricas por volta de 400-420 nm (Figura 2), um destaque para spray nanoestruturado S-3 que apresentou uma maior intensidade da banda de absorção plasmônica em relação ao S-4.

27. O mesmo perfil foi observado em estudos sobre síntese de NPsAg, pois o espectro de UV-Vis exibiu uma banda característica do íon Ag^+ , na presença do pico agudo observado na região de (400-440 nm), resultante da vibração das NPsAg na solução e apresentando um formato esférico.

28. A partir dessa análise, o spray nanoestruturado a base de alginato conjugado associados com as nanopartícula de prata, mostraram a absorbância máxima típica de nanopáticas de prata e confirmou a presença no spray nanoestruturado, preservando assim e mantendo a estrutura do produto obtido.

29. Para confirmar a estabilidade das NPsAg e do spray nanoestruturado, foi feita a determinação da análise do potencial zeta (ζ) apresentada na Tabela 2. O resultado observado do potencial zeta da NPsAg revelou o valor da carga superficial negativa de ($\zeta = -9,3 \pm 0,8$ mV) e indicou uma estabilidade na dispersão coloidal durante a obtenção das NPsAg.

30. Potencial Zeta com carga negativa é característico de nanopartícula de prata, devido à carga na superfície da partícula. O resultado da amostra S-3 apresentou o valor de ($\zeta = -52 \pm 1$ mV), esse resultado confirmou uma boa estabilidade para o spray nanoestruturado, devido a possuir carga negativa na superfície, características das NPsAg em suspensão na estrutura do material revestido com a camada de adsorção do alginato, EDC e NHS o que manteve estável ao longo do tempo.

Tabela 2 - Potencial Zeta das NPsAg e spray nanoestruturado (S-3).

Amostras	Potencial Zeta (mV)
NPsAg	$-9,3 \pm 0,8$ mV
S-3	-52 ± 1 mV

31. A análise de dados a partir do histograma de espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) foi feita para obter o raio hidrodinâmico médio das NPsAg e do spray nanoestruturado S-3 (Figura 3a-b).

32. Para as NPsAg a distribuição do raio hidrodinâmico médio das partículas obteve tamanho na faixa de 60,2 nm e o valor médio do índice de polidispersidade (PDI) de 0,30. Partículas com valor de PDI inferior a 0,5 são geralmente consideradas como de “boa” qualidade analisadas no DLS e indicou boa dispersão e estabilidade no tamanho.

33. O resultado referente ao valor médio do índice de polidispersidade (PDI) para o spray nanoestruturado S-3, também revelou boa qualidade apresentando um valor de 0,36. Em relação ao raio hidrodinâmico médio, o valor foi em torno de 1838 nm, esse valor sugere ser devido à formação de rede polimérica e interação dos componentes presentes no sistema de síntese do spray nanoestruturado S-3.

34. O espectro de UV-Vis-NIR (Figura 4), foi obtido após 15 dias da síntese e indicou que as NPsAg se mantiveram estáveis também ao longo do tempo, com isso, foi possível analisar que a o perfil e a estabilidade coloidal do spray nanoestruturado S-3 foi mantida durante o seu armazenamento, devido a apresentar suspensões estáveis e de coloração amarela que são característica de NPsAg.

35. A Figura 5 apresenta o resultado do difratograma para o spray nanoestruturado S-3, que observou a intensidade de duas bandas largas de difração em torno de $2\theta = 13,2^\circ$ e $21,9^\circ$, atribuída ao alginato com característica de um material amorfo.

36. Também foram encontrados no difratograma (Figura 5), outros dois picos mais estreitos de difração em $2\theta = 38,19^\circ$ e $44,34^\circ$, referentes às NpsAg com planos cristalográficos de (111), (200) e estrutura cúbica de face centrada (CFC), característica da prata metálica e confirmou a distribuição das NPsAg no spray nanoestruturado S-3.

37. A morfologia das nanopartículas de prata foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A Figura 6a apresentou distribuição das NPsAg predominante esféricas dispersas, de forma esféricas com tamanho característico predominante entre 20-60 nm de diâmetro, de acordo com Solomon *et al* e Jovanović *et al*. De acordo com o histograma o cálculo de distribuição de tamanho médio de partículas apresentou diâmetro de 49 ± 12 nm, calculando em torno de 160 partículas selecionadas aleatoriamente (Figura 6b).

38. Diante dos resultados entre as técnicas de TEM e DLS, observou que o tamanho das partículas do TEM foram menores que o raio hidrodinâmico obtido pelo DLS.

39. O DLS apresenta informações do raio hidrodinâmico das partículas influenciadas entre a interação do dipolo elétrico do solvente com o material conjugado/adsorvido, enquanto o TEM fornece informações apenas sobre o núcleo inorgânico.

40. Analisando os gráficos apresentados (Figura 7a-b), os módulos de armazenamento (G') e módulo viscoso (G'') para o Alg@(EDC/NHS) e para o spray nanoestruturado S-3, estiveram próximos em baixas frequências angular ($< 8,63$ Hz).

41. À medida que a frequência angular aumentou o módulo viscoso (G'') também aumentou em relação ao módulo de armazenamento (G'), característica predominante de um líquido viscoelástico onde ($G'' > G'$), possui fluxo livre, com uma estrutura polimérica mais desordenada e relaxada (Figura 7a-b).

42. Na avaliação de atividade antimicrobiana do Spray Nanoestruturado, de S-3-5mM e S-3-5mM-ETOH, observou-se que o mesmo apresentou boa atividade contra os micro-organismos testados, *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) e *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), pois apresenta concentrações reduzidas, indicando dos atividade antimicrobiana (Tabela 3).

43. Analisado os testes, é possível perceber que o menor CMI foi frente à *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) (Gram negativa), com valor de 250 µg/mL, indicando um efeito sinérgico entre as nanopartículas de prata e a matriz polimérica do hidrogel de Alg@(EDC+NHS). Esses valores são considerados promissores, uma vez que, a *klebsiella pneumoniae* é um dos patógenos mais frequentemente envolvidos em infecções hospitalares.

44. De acordo com *Kumar et al*, a penetração de NPsAg em bactérias, podem levar a mudanças na estrutura da membrana celular, devido a interação com cátions de prata o que levam ao aumento da permeabilidade da membrana, potencial osmótico perturbador e, finalmente, ruptura das células.

45. A concentração mínima bactericida das amostras S-3-5mM e S-3-5mM-ETOH, é apresentada na Tabela 3, onde as melhores CMBs foram também frente à *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) (Gram negativa). Além disso, foi encontrada uma redução frente a *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) da amostra utilizando etanol diluído, potencializando ainda mais o nosso protótipo.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana do Spray Nanoestruturado de S-3-5mM e S-3-ETOH.

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 02)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA 396)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
S-3- 5 mM	500 µg/mL	1000 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL
S-3- 5 mM- ETOH	500 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL

46. A seguir, será apresentada uma breve descrição das figuras utilizadas nesta patente de invenção. As características e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes na descrição detalhada das características e resultados preferidos da invenção, com referências às figuras anexas.

47. Figura 1. Mecanismo da reação da conjugação do alginato e os agentes de acoplamento (EDC+NHS).

48. Figura 2. Espectro de UV-Vis-NIR, da NPsAg e do spray nanoestruturado S-3 e S-4.

49. Figura 3. Distribuição do tamanho através de medida de espalhamento dinâmico da luz (DLS): a) NPsAg; b) Spray nanoestruturado S-3.

50. Figura 4. Espectro de UV-Vis-NIR, do spray nanoestruturado S-3 após 15 dias de estocagem e armazenamento em ambiente fechado. Insert da Figura 5: Imagem da amostra S-3 após 15 dias.

51. Figura 5. Difratoograma do Spray Nanoestruturado S-3.

52. Figura 6. Imagem do TEM para a) NPsAg e b) Histograma de distribuição de tamanho de partículas da NPsAg.

53. Figura 7. Análise reológica através do gráfico do módulo de armazenamento (G') e módulo viscoso (G'') versus frequência angular: a) Alg@(EDC/NHS); b) do spray nanoestruturado S-3.

54. A seguir serão apresentadas as referências utilizadas para confecção desta patente de invenção.

55. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.;... Cars, O. **Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), P1057-P1098, 2013.**

56. Levy, S. B., & Bonnie, M. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, S122-S129, 2004.

57. Möritz, M.; Peters, H.; Nipko, B.; Rüden, H. **Capability of air filters to retain airborne bacteria and molds in heating, ventilating and air-conditioning (HVAC) systems. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 203, 401-409, 2001.**

58. Lacerda RA. Infecção hospitalar e sua relação com a evolução das práticas de assistência à saúde. In: Lacerda RA. Controle de infecção em centro cirúrgico: fatos, mitos e controvérsia. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 9-23.

59. Aydemir, D.; Ulusu, N.N. Correspondence: angiotensin-converting enzyme 2 coated nanoparticles containing respiratory masks, chewing gums and nasal filters may be used for protection against COVID-19 infection. *Trav. Med. Infect. Dis.*, 101697, 2020.

60. Hamouda, T.; Ibrahim, H.M.; Kafafy, H.H.; Mashaly, H.M.; Mohamed, N.H.; Aly, N.M. Preparation of Cellulose-Based Wipes Treated with Antimicrobial and Antiviral Silver Nanoparticles as Novel Effective High-Performance Coronavirus Fighter. *Int. J. Biol. Macromol.*, 181: 990-1002, 2021.

61. Zachar, O.J.S.P. Formulations for COVID-19 Early Stage Treatment via Silver Nanoparticles Inhalation Delivery at Home and Hospital, 2020.

62. Rosa, R.M.; Silva, J.C.; Sanches, I.S.; Henriques, C. **Simultaneous photo-induced cross-linking and silver nanoparticle formation in a PVP electrospun wound dressing**, *Mater. Lett.*, 207: 145-148, 2017.

63. Kirschner, C. M.; Anseth, K. S. Hydrogels in Healthcare: From Static to Dynamic Material Microenvironments. *Acta Materialia*, 61: 931-944, 2013.

64. Garg, T.; Singh, O.; Arora, S.; & Murthy, R. S. R. **Scaffold: A novel carrier for cell and drug delivery**. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 29(1): 1-63, 2012.

65. Gustafson, C. T.; Boakye-Agyeman, F.; Brinkman, C. L.; Reid, J. M.; Patel, R.; Bajzer, Z.; Yaszemski, M. J. **Controlled delivery of vancomycin via charged hydrogels**. *PLoS One*, 11(1), 2016.

66. Lee, K.Y.; Mooney, D.J. **Alginate: properties and biomedical applications**. *Progr. Polym. Sci.* 37: 106-126, 2012.

67. Pawar, S. N.; Edgar, K. J. **Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications**. *Biomaterials*, 33: 3279-3305, 2012.

68. Yang, B. et al. **Facilely prepared inexpensive and biocompatible self-healing hydrogel: a new injectable cell therapy carrier**. *Polymer Chemistry*, 3,(12): 3235-3238, 2012.

69. Cholewinski, A.; Yang, F. K.; Zhao, B. **Underwater Contact Behavior of Alginate and Catechol-Conjugated Alginate Hydrogel Beads.** *Langmuir*, 33:8353–8361, 2017.
70. Lee, P. C.; Meisel, D. **Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols.** *J. Phys. Chem.*, 86:3391, 1982.
71. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. **A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.** *Faraday Discussions London*, 11: 55, 1951.
72. Rasso, G.; Salis, A.; Porcub, E. P.; Giunchedi, P.; Roldo, M.; Gavin, E. **Composite chitosan/alginate hydrogel for controlled release of deferoxamine: a system to potentially treat iron dysregulation diseases.** *Carbohydrate Polymers*, 136:1338–1347, 2016.
73. Fan, L. et al. **Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 93:582–590, 2016.
74. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 30th ed. CLSI, supplement M100. Wane, P.A. 2020.
75. Solomon, S. D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingan, A. V.; Rutkowsky, S. A.; Boritz, C. **Synthesis and study of silver nanoparticles.** *Journal of Chemical Education*, 84:322, 2007.
76. Jahan, I.; George, E.; Saxena, N.; Sen, S. **Silver-Nanoparticle-Entrapped Soft GelMA Gels as Prospective Scaffolds for Wound Healing.** *ACS Appl. Bio Mater*, 2019.
77. Fafal, T. et al. **Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Asphodelus aestivus* Brot. aerial part extract.** *South African Journal of Botany*, 112: 346–353, 2017.

78. Chen, K.; Wang, F.; Liu, S.; Wu, X.; Xu, L.; Zhang, D. In situ reduction of silver nanoparticles by sodium alginate to obtain silver-loaded composite wound dressing with enhanced mechanical and antimicrobial property. *Int. J. Biol. Macromol.*, 148: 501-509, 2020.

79. Guo, C.; Cui, W.; Wang, X.; Lu, X.; Zhang, L.; Li, X.; Li, W.; Zhang, W.; Chen, J. Poly-L-lysine/SodiumAlginate Coating Loading Nanosilver for Improving the Antibacterial Effect and Inducing Mineralization of Dental Implants. *ACS Omega*, 5: 10562-10571, 2020.

80. Porter, G.C.; Schwass, D.R.; Tompkins, G.R.; Bobbala, S.K.R.; Medlicott, N.J.; Meledandri, C.J. AgNP/Alginate Nanocomposite hydrogel for antimicrobial and antibiofilm applications. *Carbohydr. Polym.*, 251: 117017, 2021.

81. Ramalingam, B.; Parandhaman, T.; Das S.K. Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, 2016.

82. Khan, M. J.; Shameli, K.; Sazili, A. Q.; Selamat, J.; Kumari, S. Rapid green synthesis and characterization of silver nanoparticles arbitrated by curcumin in an alkaline medium. *Molecules*, 24:719, 2019.

83. Gicheva, G.; Yordanov, G. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Removal of citrate-coated silver nanoparticles from aqueous dispersions by using activated carbon. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 431: 51-59, 2013.

84. Ahsan, A.; Farooq, M. A. Therapeutic Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles Loaded PVA Hydrogel Patches for Wound Healing. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 54 (September), 101308, 2019.

85. Dao, H. M.; Chen, J.; Tucker, B. S.; Thomas, V.; Jun, H. W.; Li, X. C.; Jo, S. Hemopressin-Based PH-Sensitive Hydrogel: A Potential Bioactive Platform for Drug Delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4 (7): 2435-2442, 2018.

86. Gola, A.; Bernardi, A.; Pasut, G.; Musiał, W. **The Influence of Initiator Concentration on Selected Properties of Thermosensitive Poly(Acrylamide-Co-2-Acrylamido-2-Methyl-1-Propanesulfonic Acid) Microparticles.** *Polymers (Basel)*, 13 (7): 1-27, 2021.

87. Su, C. H. et al. **Preparation of cotton fabric using sodium alginate-coated nanoparticles to protect against nosocomial pathogens.** *Biochemical Engineering Journal*, 117:28-35, 2017.

88. Li, W. et al. **Poly (vinyl alcohol)/sodium alginate/layered silicate based nanofibrous mats for bacterial inhibition.** *Carbohydrate Polymers*, 92: 2232-2238, 2013.

89. Jovanović, Z. et al. **Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method.** *Materials Chemistry and Physics*, 133: 182-189, 2012.

90. Niloy, M. S.; Hossain, M. M.; Takikawa, M.; Shakil, M. S.; Polash, S. A.; Mahmud, K. M.; Uddin, M. F.; Alam, M.; Shubhra, R. D.; Shawan, M. M. A. K.; Saha, T.; Takeoka, S.; Hasan, M. A.; Ranjan Sarker, S. **Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles Using Caesalpinia Digyna and Investigation of Their Antimicrobial Activity and in Vivo Biocompatibility.** *ACS Appl. Bio Mater.*, 3 (11):7722-7733, 2020.

91. Ahluwalia, V.; Elumalai, S.; Kumar, V.; Kumar, S.; Sangwan, R. S. **Nano silver particle synthesis using Swertia paniculata herbal extract and its antimicrobial activity.** *Microb. Pathog.*, 114: 402-408, 2018.

92. Feng, L.; Cao, Y.; Xu, D.; Wang, S.; Zhang, J. **Molecular weight distribution, rheological property and structural changes of sodium alginate induced by ultrasound.** *Ultrasonics Sonochemistry*, 34:609-615, 2017.

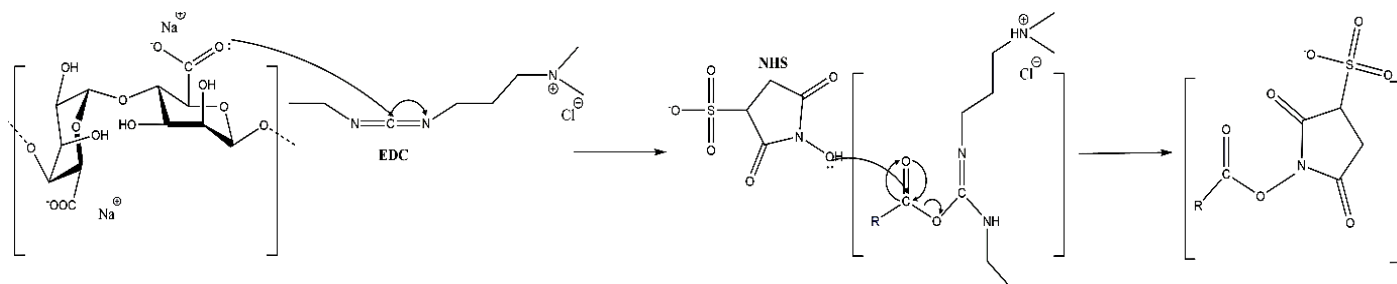
93. García, A.; Culebras, M.; Collins, M.N.; Leahy, J.J. **Stability and rheological study of sodium carboxymethyl cellulose and alginate suspensions as binders for lithium ion batteries.** *Appl. Polym. Sci.*, 135: 46217, 2018.

94. Gratieri, T.; Gelfuso, G.M.; Rocha,E.M.; Sarmiento,V.H.; de Freitas, O.; Lopez, R.F.V. **A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery.** *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 75:186-193, 2010.
95. Bitsch, B.; Dittmann, J.; Schmitt, M.; Scharfer, P.; Schabel, W.; Willenbacher, N. **A novel slurry concept for the 10 fabrication of lithium-ion battery electrodes with beneficial properties.** *J. Power Sources*, 265:81, 2014.
96. Deresinski SC, Schirmer P. **Management of infections due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*.** *Med Rep*, 79(1):1-4, 2009.
97. Kumar, M.; Bansal, K.; Gondil, V. S.; Sharma, S.; Jain, D. V. S.; Chhibber, S.; Sharma, R. K.; Wangoo, N. **Synthesis, Characterization, Mechanistic Studies and Antimicrobial Efficacy of Biomolecule Capped and PH Modulated Silver Nanoparticles.** *J. Mol. Liq.*, 249:1145-1150, 2018.

REIVINDICAÇÕES

01. Spray Nanoestruturado **caracterizado por** ser constituído por hidrogel de alginato de sódio conjugado com agentes de acoplamento (EDC/NHS), associados a soluções de nanopartículas de prata.
02. Spray Nanoestruturado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** uma formulação preferencial a partir da hidratação de 0,08-0,20g do pó de alginato de sódio, com 0,0014-0,006g dos agentes de acoplamento (EDC-NHS) em 5-15mL de água Milli-Q, adicionando 1-8mL da solução de nanopartículas de prata com concentração de 1-5 mM de AgNO₃.
03. Uso do Spray Nanoestruturado definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser utilizado contra as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*).

DESENHOS



R= Alginato

Figura 1

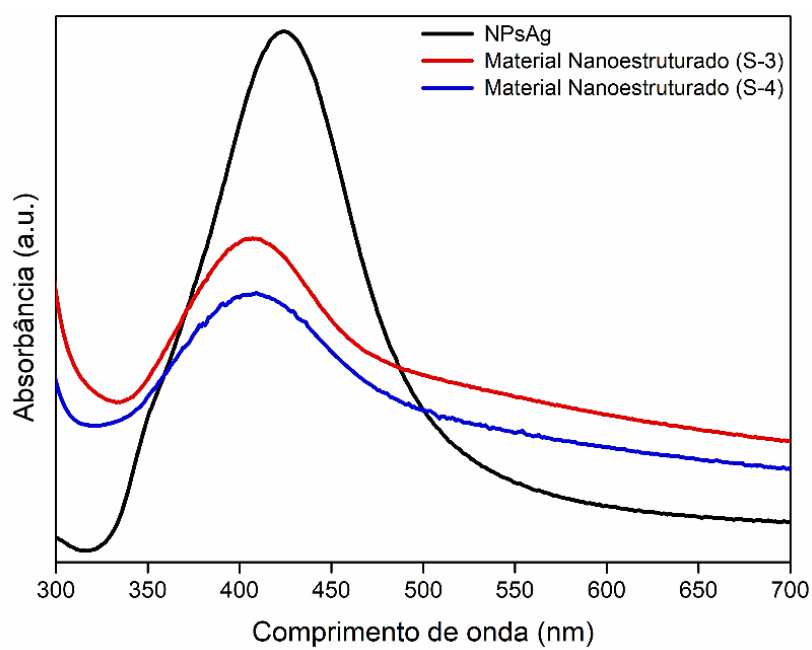


Figura 2

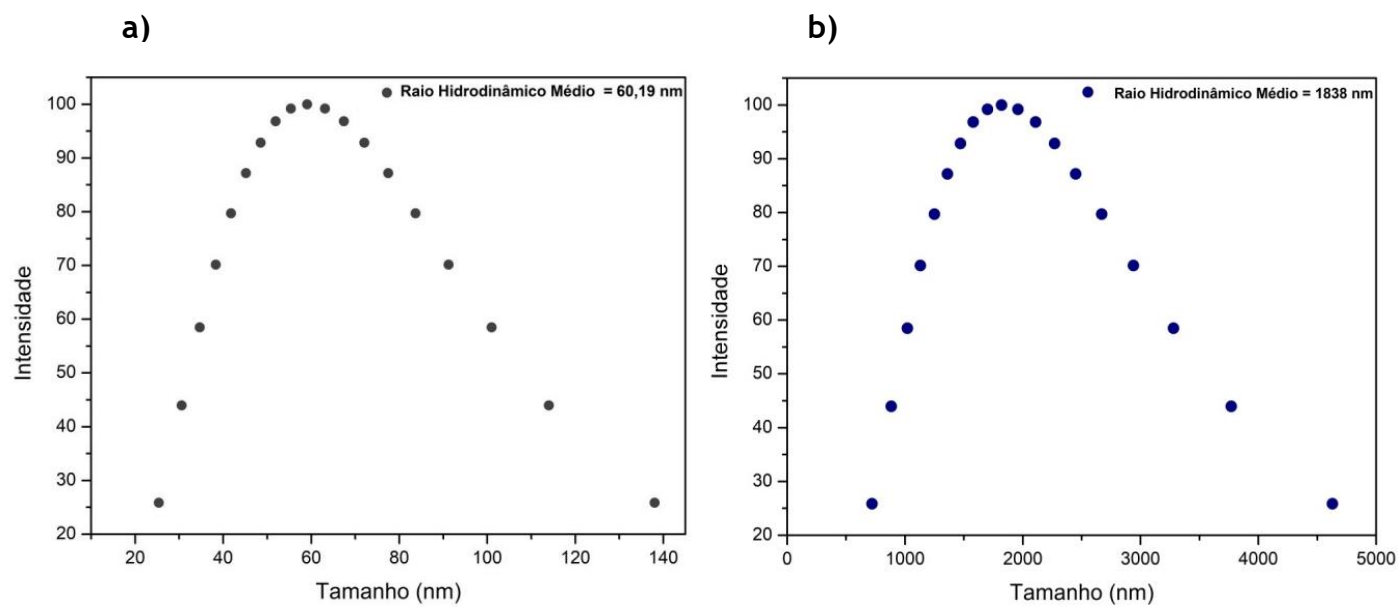


Figura 3

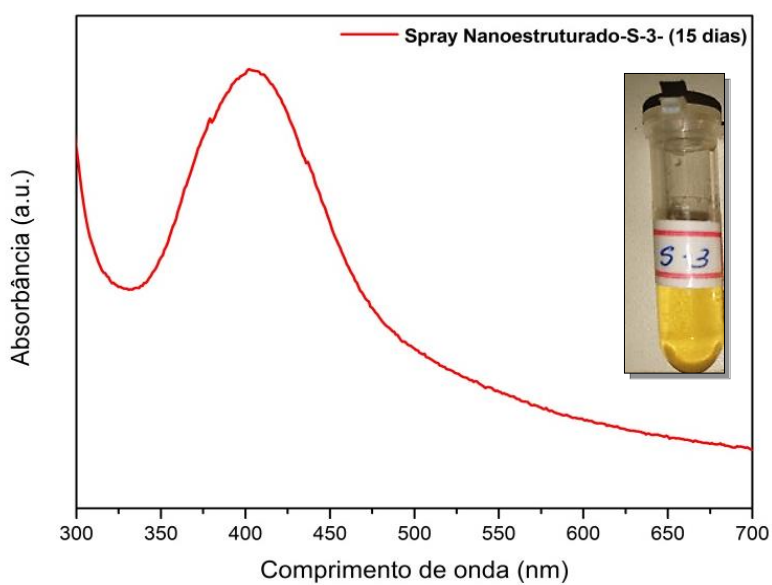


Figura 4

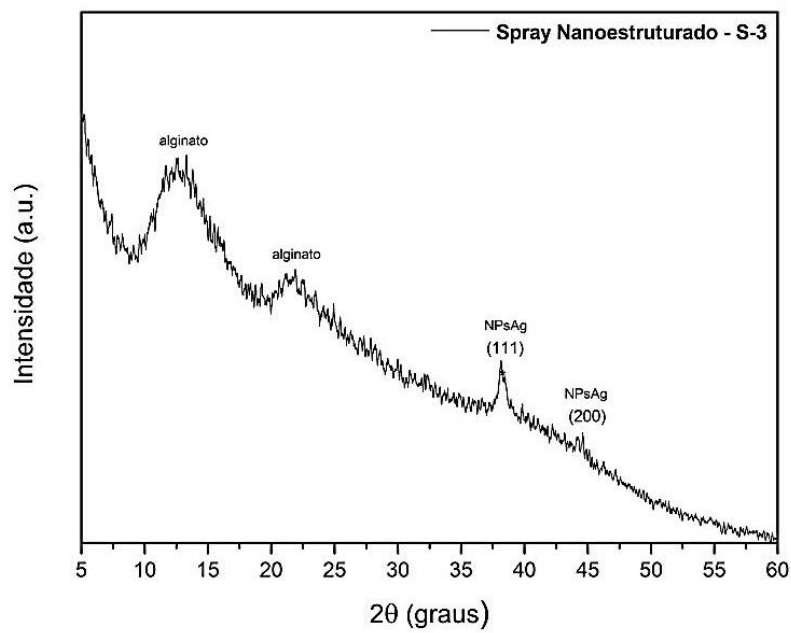


Figura 5

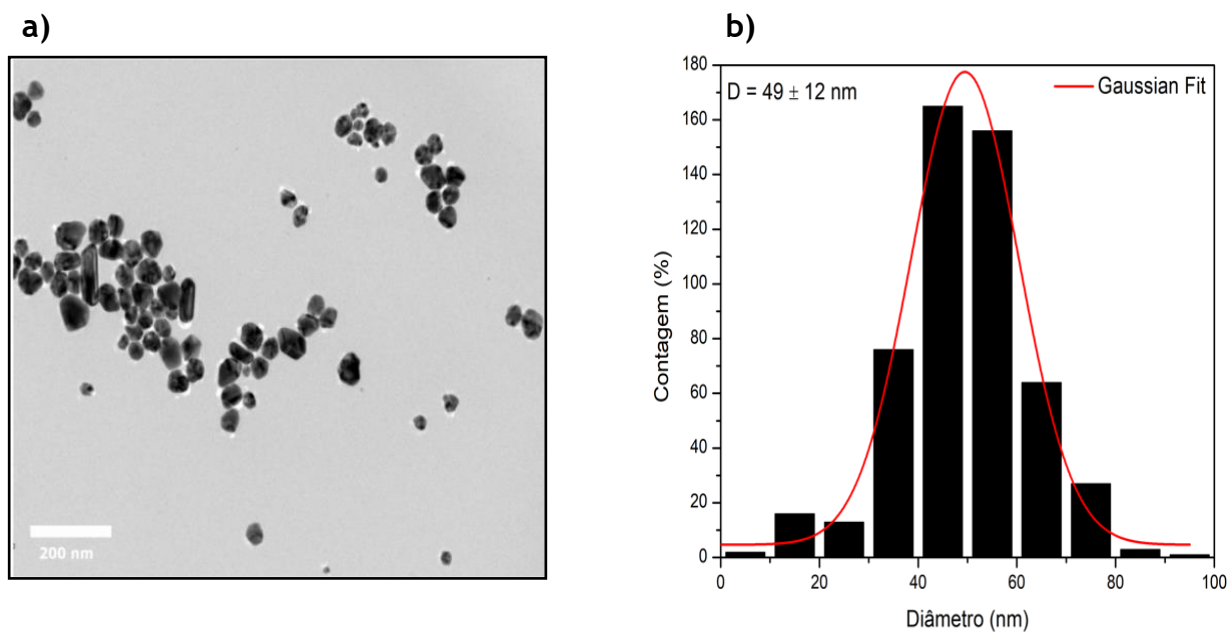


Figura 6

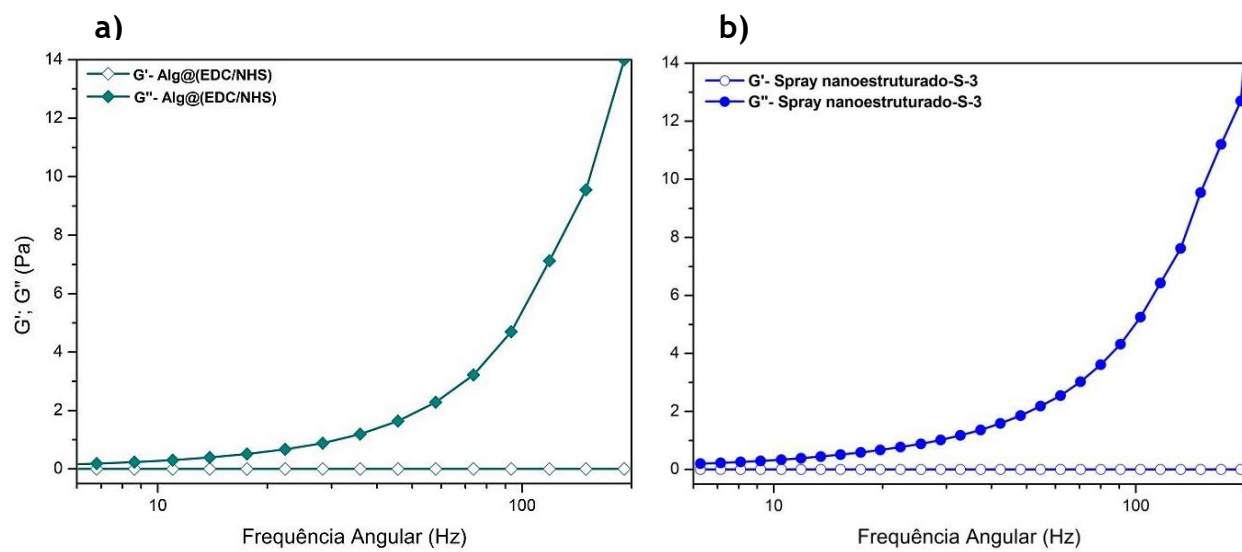


Figura 7

RESUMO

SPRAY NANOESTRUTURADO DE NPsAg-ALGINATO@(EDC/NHS) CONJUGADO, POSSUINDO ATIVIDADE FRENTE A *Staphylococcus aureus* E *Klebsiella pneumoniae*.

É divulgado nesta patente de invenção um Spray Nanoestruturado formado por hidrogel de alginato de sódio conjugado com agentes de acoplamento (EDC/NHS), associados com nanopartículas de prata, (NPsAg-alginato@(EDC/NHS), a ser utilizado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O spray nanoestruturado apresentou atividade frente as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*).