



(21) BR 102023018024-8 A2

(22) Data do Depósito: 05/09/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
18/03/2025

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(54) **Título:** MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UMA EMULSÃO CONTENDO UM ÓLEO ESSENCIAL COMO INGREDIENTE ATIVO, EMULSÃO PICKERING E USO DE UMA EMULSÃO PICKERING

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/61; A61K 31/722; A61P 31/04; A61P 31/12.

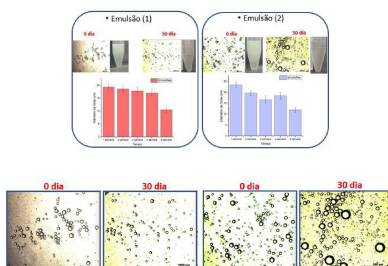
(52) **CPC:** A61K 36/61; A61K 31/722; A61P 31/04; A61P 31/12.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - UFABC.

(72) **Inventor(es):** GREICIELE DA SILVA FERREIRA; ALANA GABRIELI DE SOUZA; DERVAL DOS SANTOS ROSA.

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UMA EMULSÃO CONTENDO UM ÓLEO ESSENCIAL COMO INGREDIENTE ATIVO, EMULSÃO PICKERING E USO DE UMA EMULSÃO PICKERING A presente invenção se refere a um método para preparação de emulsões de Pickering antimicrobianas estabilizadas por partículas sólidas de quitosana adsorvidas na interface óleo/água composta por matérias primas naturais e atóxicas. As emulsões apresentam uma fase de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMA) dispersa em uma fase aquosa, estabilizadas com micro e nanopartículas de quitosana (Qs). Ademais, a emulsões apresentam atividade antibiótica contra bactérias, fungos e vírus.

Figura 1



“MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UMA EMULSÃO CONTENDO UM ÓLEO ESSENCIAL COMO INGREDIENTE ATIVO, EMULSÃO *PICKERING* E USO DE UMA EMULSÃO *PICKERING*”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção descreve o desenvolvimento de emulsões de *Pickering* antimicrobianas estabilizadas por partículas sólidas de quitosana adsorvidas na interface óleo/água composta por matérias-primas naturais e atóxicas. As emulsões apresentam uma fase de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMa) dispersa em uma fase aquosa, estabilizadas com micro e nanopartículas de quitosana (Qs).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Após a declaração de emergência de saúde pública internacional pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em janeiro de 2020 devido à Doença de Coronavírus 2019 (COVID-19) causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2), diversos esforços em todo o mundo foram realizados por indústrias e cientistas no âmbito do desenvolvimento de novas soluções com características antimicrobianas cada vez mais eficazes para evitar a transmissão de doenças causadas por micro-organismos patogênicos (GORDON et al., 2020).

[003] Dentre os principais agentes sanitizantes, destacam-se composto quaternários de amônio ou peróxido de hidrogênio, além de outros compostos sintéticos. No entanto, as crescentes preocupações ambientais e de saúde têm refletido na busca por novos produtos ambientalmente amigáveis. Nesse sentido, os óleos essenciais têm surgido como promissores agentes bacterianos, fúngicos e antivirais para uma

ampla gama de aplicações. Isto se deve à sua composição por envolver uma mistura diversificada de compostos orgânicos com propriedades antimicrobianas que geralmente apresentam um efeito antimicrobiano sinérgico quando combinados.

[004] Os óleos essenciais são uma mistura complexa de hidrocarbonetos, terpenos, terpenoides e álcoois terciários. O mecanismo de ação dos óleos essenciais dependerá da sua composição. Em geral, eles apresentam ativos com características hidrofílicas e hidrofóbicas, capazes de permear e danificar a membrana citoplasmática (camada fosfolipídica) e a parede celular com vazamento do conteúdo celular dos microrganismos (AZIZ et al., 2018; MONDELLO et al., 2022; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010; WANI et al., 2021; YADALAM et al., 2021).

[005] Estudos anteriores indicam que muitos óleos essenciais têm sido eficazes na inibição de uma ampla gama de microrganismos, incluindo vírus de RNA e DNA, como o vírus da gripe aviária A, vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), vírus dengue tipo 2, vírus Junin, adenovírus vírus influenza tipo 3, poliovírus e vírus Cocksackie B1 (POURGHANBARI et al., 2016; TARIQ et al., 2019).

[006] Apesar de suas excelentes propriedades bioativas, os óleos essenciais apresentam algumas limitações como alta volatilidade, baixa solubilidade, alta tendência a degradação e oxidação, exigindo o uso de diferentes abordagens para estabilizar e proteger estes compostos, como encapsulamento e emulsificação (REIS, 2020), aumentando os seus tempos de prateleira e conservando as atividades biológicas, este fato é essencial para diversas aplicações (MEYERS et al., 2021).

[007] O uso prático do OEMa é frequentemente limitado por vários inconvenientes que podem ocorrer durante o manuseio e armazenamento devido à elevada susceptibilidade dos seus componentes sofrerem reações químicas ou degradação, como oxidação, isomerização,

polimerização e rearranjo que dependem principalmente de parâmetros ambientais como temperatura, luz e oxigênio atmosférico (TUREK; STINTZING, 2013). Esses problemas de instabilidade podem resultar em uma redução ou perda de eficácia dos componentes ativos dos OEMa, sendo um problema grave em termos de aplicação tecnológica. Além disso, OEMa é insolúvel em água, apresentando alta volatilidade e tempo de meia-vida curto, resultando em difícil manuseio (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010).

[008] Existem diferentes tipos de emulsões, sendo as mais comuns a emulsão de óleo em água (O/A) e a emulsão de água em óleo (A/O). A emulsão O/A apresenta uma fase de água contínua e uma fase de óleo dispersa, enquanto a emulsão de A/O tem uma fase de óleo contínua e uma fase de água dispersa. As emulsões precisam ser estabilizadas por agentes emulsificantes para garantir que estes sistemas multifásicos fiquem estáveis termodinamicamente (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2014).

[009] A emulsificação é uma tecnologia de estabilização definida como uma mistura de uma fase aquosa e uma fase oleosa. Nesse sistema, as gotas são consideradas como a fase dispersa e o líquido em que se encontram corresponde à fase contínua. A dispersão de uma fase em outra visando obter um sistema homogêneo o qual ocorre por meio de moléculas anfifílicas capazes de diminuir a tensão interfacial entre as fases, resultando em elevada estabilidade termodinâmica (TADROS 2016, FRANZOL; REZENDE, 2015). Para garantir a estabilidade de uma emulsão, aditivos emulsificantes são adicionados, como surfactantes sintéticos. No entanto, estes compostos aumentam a toxicidade e causando problemas ambientais por sua baixa biodegradabilidade (SOUZA et al., 2020).

[010] Diferentemente das emulsões normais, as emulsões *Pickering* são emulsões estabilizadas com partículas sólidas ao invés dos

tensoativos clássicos (E. DICKINSON, 2012).

[011] Fortes forças repulsivas, como forças estéricas e eletrostáticas geradas a partir da camada de moléculas do emulsificante na interface óleo-água, inibem a agregação de gotículas. Neste sistema, os emulsificantes moleculares absorvidos estão em equilíbrio com os não absorvidos. Por outro lado, em uma emulsão de *Pickering*, as partículas que são parcialmente molhadas pelas fases de óleo e água são irreversivelmente absorvidas na interface sem diminuir significativamente a tensão interfacial. Essas partículas formam uma barreira mecânica contra a coalescência de gotículas (Cahyana, Y. et al, 2022).

[012] As emulsões de *Pickering* são objetos de grande interesse de pesquisa hoje em dia (Asma Sharkawy, et al, 2022). Este interesse renovado é atribuído à crescente conscientização em relação aos riscos ambientais e problemas adversos à saúde relacionados aos surfactantes de baixo peso molecular, bem como aos avanços contínuos nas técnicas de produção e caracterização das nanopartículas (M. Rayner, et al, 2014).

[013] Neste sentido, o sistema de emulsão *Pickering* seja uma solução para óleos essenciais hidrofóbicos e propensos à oxidação. Este método permite que os óleos essenciais proporcionem um melhor efeito no produto resultante e mantenham os benefícios de seus componentes bioativos.

[014] A quitosana é um biopolímero de fonte renovável com capacidade de atuar como um agente emulsificante. Este polímero pode ser usado na forma de partículas sólidas como estabilizante de emulsões *Pickering*. Essa classe de emulsões é caracterizada por ser estabilizada por partículas sólidas como substitutos aos surfactantes. Em comparação com as emulsões convencionais que são estabilizadas por surfactantes orgânicos, (ZHAI et al., 2018).

[015] A quitosana é um polímero natural obtido pela desacetilação parcial da quitina (E.S. de Alvarenga, et al., 2010). O referido composto consiste em unidades de D-glucosamina ligadas a β -(1-4) e unidades de N-acetil-D-glucosamina (D. Wu, et al, 2020).

[016] A quitosana vem sendo selecionada para preparar nanopartículas para estabilizar emulsões de *Pickering*, uma vez que excelente propriedade de adesão e muitos outros efeitos positivos para a cicatrização de feridas, como estimular a hemostasia, acelerar a regeneração tecidual e promover a proliferação de fibroblastos (L. Fan, et al. 2018).

[017] Além disso, as nanopartículas de quitosana também têm boa biocompatibilidade, bioadesividade e biodegradabilidade (M.H. Asfour, et al., 2017).

[018] O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMa) é composto de hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados. Os terpenos são hidrocarbonetos voláteis e aromáticos e podem ser considerados polímeros do isopreno, que tem a fórmula C_5H_8 (C. F. Carson, et al. 2006).

[019] Conhecido como óleo de árvore do chá, é extraído de uma planta nativa da Austrália e tem ganhado crescente interesse na Europa, Japão e Estados Unidos devido às suas propriedades antimicrobianas (antifúngica, antiviral, antibacteriana), antitumoral, antioxidante, antissépticas e anti-inflamatórias (GIORDANI et al., 2006; KAUSHIK et al., 2020; MERONI et al., 2020; PUVA et al., 2020).

[020] Por estes motivos, OEMa tem sido utilizado em produtos para cuidados da pele e feridas, infecções respiratórias, fabricação de medicamento homeopáticos, tratamento da mucosa fúngica e infecções cutâneas (GIORDANI et al., 2006; PUVA et al., 2020; VETERE et al., 2020).

[021] Esse óleo essencial é composto de hidrocarbonetos terpênicos, em particular monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois associados, consistindo em uma mistura de aproximadamente 100 compostos incluindo, terpenos aldeídos, ésteres, álcoois, 1,8-cineol, terpinoleno e monoterpenóides. Contudo, apesar das excelentes propriedades antimicrobianas já bem descritas na literatura, possui algumas limitações para conserva suas propriedades (GAROZZO et al., 2011; OLIVA et al., 2018; ROANA et al., 2021, ROANA et al., 2021, OLIVA et al., 2018 e LI et al., 2016).

[022] Bao et al, 2020 revela emulsões *Pickering* são aquelas estabilizadas por partículas sólidas. Os autores desenvolveram uma emulsão de *Pickering* emulsificando com uma mistura de curcumina (10 ug/mL) dissolvida em vários óleos, dentre eles o óleo de *Melaleuca alternifolia*. Depois desta etapa, os óleos contendo curcumina foram misturadas com a suspensão de nanopartícula de quitosana obtida por meio de NaOH (Hidróxido de sódio).

[023] As emulsões de *Pickering* desses autores tem como finalidade de promover o processo de cicatrização de feridas por meio de pulverização por esse motivo a estabilização por meio de formação de rede é favorável, pois causa um aumento na viscosidade levando uma melhora na propriedade de aderência.

[024] Na presente invenção, o óleo de *Melaleuca alternifolia* é utilizado de forma pura, sem misturas ou curcumina, sendo que a mistura entre ele e as nanopartículas visa obter um efeito sinérgico e potencializado. Ademais, o uso do óleo em sua forma pura visa realizar um processo mais simples de preparo e sem o uso de etapas adicionais, que envolveriam maior gasto energético e financeiro.

[025] Ademais, o referido trabalho utilizou-se o uso de hidróxido de sódio, substância conhecida pelo seu elevado pH e

propriedades corrosivas. Em nosso trabalho, não utilizamos NaOH, mas sim apenas uma pequena quantidade de ácido acético, destacando as diferenças de processo nesse ponto, além de termos empregado um processo ambientalmente amigável.

[026] Por fim, outro aspecto importante é o tamanho de partícula. Em nossa proposta, empregamos partículas micrométricas, conforme imagem abaixo, enquanto os autores do trabalho utilizaram partículas nanométricas. Essa diferença de escala impacta em variações na área superficial e propriedades físico-químicas conhecidas na literatura. Essa variação muda a disponibilidade das partículas no meio, sua ação conjunta com o óleo essencial, capacidade de estabilização, entre outras propriedades importantes. Além disso, enquanto as nanopartículas possuem questões relacionadas com segurança em termos de saúde devido a uma possível bioabsorção pelas células, as micropartículas não possuem propriedades inseguras reconhecidas

[027] Já Cahyana, Y. et al, 2022 revelam emulsões *Pickering* como transportadores para o óleo de tea tree encapsulado resultam em um efeito de liberação sustentada e aumentam os efeitos antibacterianos contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

[028] Entretanto, o artigo mostra que as Emulsões de *Pickering* apresentaram o potencial Zeta de +24 mV. A presente invenção proposta apresenta menos etapas de processo, com uso de pouco material e com potencial Zeta superior (+71mV) ou seja, alta estabilidade ao longo do tempo. Outro aspecto importante é que essas cargas são associadas a características intrínsecas das emulsões, e como nosso sistema apresentou o triplo de cargas disponíveis, as propriedades de ambos os sistemas não são comparáveis. Essa variação impacta propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antivirais de formas diferentes devido ao mecanismo de ação

[029] Um outro ponto importante a ressaltar é que nessas

emulsões de *Pickering* descrita no artigo, os autores descrevem aplicações de vários óleos essenciais e diferentes estabilizadores de partícula em sistemas de Emulsão de *Pickering*, porém são mostradas diversas formas de estabilização dentre elas o uso de curcumina, controle de pH, uso de substâncias corrosivas como hidróxido de sódio, equipamentos relativamente caros para dispersão de partículas, entre outros. A presente invenção conta com uma forma inovadora de misturar os estabilizantes com um auxílio mínimo de um reagente menos agressivo (Ac. Acético) ao ambiente e mesmo assim alcançando alto padrão de estabilidade como já descrito

[030] Ferreira, G.S, et al. (2023) afirmam que o óleo de *tea tree* é altamente susceptível à oxidação devido ao intemperismo. Portanto, a estabilização dos componentes deste óleo é essencial para preparação de emulsões eficientes. Neste sentido foi testada emulsões *Pickering* usando nanofibrilas de celulose (CNF) como um agente estabilizante.

[031] Ocorre que o método de preparação do estabilizante é completamente diferente da presente invenção. A CNF utilizada no processo de estabilização é dispersada em uma solução aquosa com o auxílio de ponteira de ultrassom, não é adicionado nem um tipo de reagente nessa mistura, e em seguida é utilizada como emulsificante na preparação da emulsão de *Pickering*.

[032] A presente invenção utiliza como estabilizante a partícula de quitosana e este emulsificante não precisa ser disperso, o que torna a tecnologia economicamente viável na escala industrial por não precisa dessa força mecânica para auxiliar no processo de recobrimento das gotas, ao contrário a Micropartícula de quitosana tem um processo simples sendo adicionada uma pequena quantidade de Ác. Acético (0,5%) para contribuir com o processo de estabilização da Emulsão de *Pickering*.

[033] A CNF utilizada no artigo, estabiliza a emulsão de

Pickering por meio de impedimento estérico. As nanofibrilas de celulose formam uma rede 3D levando a obstáculos estéreis, logo as gotículas de OEMa continuam a ser impedidas de coalescer pelo CNF que são adsorvidas e rodeadas nas suas superfícies.

[034] A estabilização da emulsão de *Pickering* estabilizada por partícula de quitosana da presente invenção, ocorre por um mecanismo eletrostático evidenciado pelas diferenças de cargas da quitosana com interações com os ativos do óleo de *Melaleuca alternifolia*. A alta estabilidade das emulsões é atribuída ao grupo amina (+) da Cs, que podem ser neutralizados parcialmente através da interação com alguns grupos carregados negativamente da *Melaleuca alternifolia* durante a adsorção na interface gota/óleo (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010)

[035] Asma, S. et. Al. (2022) é direcionado para preparação de uma emulsão *Pickering* compreendendo CBD estabilizada em quitosana/goma arábica, sendo o estabilizante somente dissolvido em ácido acético (0,1N) através de agitação magnética. A goma arábica se mostra como um estabilizante natural, de baixo e custo e sustentável.

[036] Em relação à presente invenção, o referido trabalho se utiliza do estabilizante quitosana com auxílio da goma arábica. Na presente invenção, o emulsificante foi a quitosana com características diferentes e sem o auxílio da Goma arábica.

[037] Asma, S. et. Al. (2022) apresenta uma modificação química por meio de complexos com o auxílio da Goma Arábica. A presente invenção, optou por uma estabilização sem o uso de formação de complexos, obtendo uma solução adequada para a fabricação da *Pickering*, além disso, a quantidade de ácido fraco (Ac. acético) é bem menor, justamente por não usarmos técnicas de modificação química, esta peculiaridade promove um efeito de sustentabilidade com menor prejuízo Ambiental por fazermos uso de menos recursos.

[038] Ainda sobre este artigo, o objetivo da desacetilação da quitina é forma a quitosana. O grau de desacetilação, como distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais de matéria prima e dos processos de método de preparação levando uma variação entre 40 e 95% no grau de desacetilação (acima de 50% o polímero se torna solúvel em soluções aquosas).

[039] São analisados alguns fatores para a obtenção da quitosana a partir da quitina, dentre eles (concentração da solução alcalina, temperatura de reação, tempo de reação, tamanhos das partículas da quitina, impurezas). As condições utilizadas durante a reação de desacetilação da quitina influenciam na massa molar do polímero da quitosana e conseqüentemente no seu grau de desacetilação (porcentagem de grupos amino livres existentes na estrutura após a retirada do grupo acetil).

[040] Esses fatores listados mostram a dificuldade de se obter uma quitosana com um grau de desacetilação alto. O referido documento utilizou no seu processo, uma quitosana com 96% (Elevado DDA%), esse índice de (DDA%) é importante para analisar se a quitosana apresenta potencial para ser utilizada como matéria prima de estudos de pesquisa e insumos para a fabricação de produtos dela dependentes.

[041] Quanto maior a porcentagem de (DDA%), maior é a facilidade de modificação para uma escala nanométrica, aumentando assim a área superficial, além do mais, existe a presença de um maior número de grupo amino na estrutura, logo o AUMENTO do nível de desacetilação é um fator importante, pois permite uma maior adsorção das partículas nas interfaces, levando a formação de gotas esféricas pequenas (morfologia) melhorando a estabilidade do sistema, em razão disso, índices elevados de (DDA%) são obtidos por meio de processos mais rigorosos e conseqüentemente o valor monetário da quitosana tende a aumenta, quando

se trata de execução do processo, esses dados são relevantes uma vez que afetam o valor do produto final.

[042] Um das diferenças do referido artigo para o presente pedido é a diferença da desacetilação, o autor do Documento D7 usa desacetilação em torno de 96%, enquanto nós usamos a quitosana com (DDA%) em torno de (75 - 80%). Como já foi dito, quanto maior o grau de desacetilação mais fácil é a manipulação do uso da quitosana, e o aumento da influência diretamente nas propriedades das partículas, no entanto, a presente invenção utilizou-se de um grau de desacetilação bem menor e foram obtidos ótimos resultados, sendo alcançado o nível de +71mV de acordo com o potencial zeta.

[043] É ressaltado o referido artigo alcançou uma estabilidade de $+68.5 \pm 4.9$ mV e $+46.7 \pm 1.7$ mV, no entanto, os autores conseguiram esse potencial zeta com o uso de uma quitosana com alto grau de desacetilação (DDA%) como já descrito, o (DDA%) afeta as propriedades positivamente das partículas de quitosana, e quanto maior esse grau de desacetilação mais fácil é de alcançar alta estabilidade. De acordo com o artigo, o grau de desacetilação de 96% (DDA %) alcançou potencial Zeta $+68.5 \pm 4.9$, enquanto o 78% (DDA%) obteve o potencial Zeta de $46,7 \pm 1.7$ mV, nesse sentido, observa-se o quanto é importante o uso de uma quitosana com alto grau de desacetilação para conseguir uma alta estabilidade em emulsões de *Pickering*.

[044] A presente invenção consiste em uma quitosana com baixo grau de desacetilação (75-85%) e sem a utilização de goma arábica para auxiliar na estabilização da *Pickering*. O referido documento empregou a goma arábica no processo de estabilização. A literatura mostra o uso da quitosana com goma arábica, pois, as partículas de quitosana têm sido relatadas como sendo altamente hidrofílicas carregadas positivamente, sendo assim, o uso da goma arábica é importante para o processo de

estabilização de *Pickering* por possuir carga oposta da quitosana, aumenta a reatividade com a cadeia polimérica, resultando assim, numa maior interconexão do polímero (complexação). Este fato fundamenta o motivo dos autores alcançarem uma boa estabilidade em *Pickering*.

[045] Em contrapartida o processo de estabilização da presente invenção utiliza apenas a quitosana (1 mL de Ác. Acético para 1g de quitosana), e com isso, é obtido um alto potencial Zeta +71mV, manuseando durante o procedimento menos reagentes e consequentemente diminuindo o número de etapas envolvida na fabricação da emulsão *Pickering*

[046] Com isso fica claro os avanços trazidos pela presente invenção, a saber, um processo simples, com uso de menos reagentes, e sem precisar de muitos equipamentos e com bons resultados.

[047] Ainda sobre Asma, S. et. Al. (2022), o processo de estabilização de *Pickering* do referido artigo evidencia que as partículas foram preparadas através da complexação de polielectrólitos entre a quitosana e a goma-arábica seguindo uma metodologia completamente diferente da proposta pela presente invenção.

[048] A metodologia empregada pelo referido trabalho consiste em uma modificação na estrutura da quitosana, em resumo 1g de quitosana foi dissolvida em 50mL de ácido acético (0,1 N), seguindo da adição de uma solução de goma arábica (constituída por 1g de goma arábica dissolvida em 50mL de água deionizada) de forma gota a gota com agitação magnética constante (800 rpm) durante 30min, controlando o pH D7[4, 5].

[049] A metodologia da presente invenção apresenta um processo mais simples de estabilização com uma quitosana com (DDA%) entre (75-80%), ou seja, a presente invenção apresenta uma quitosana inferior no grau de desacetilação quando comparada com quitosana usada

no artigo, além de usar uma quantidade ácido acético infinitamente menor, (Asma, S. et. Al. (2022)-50mL para 1g / presente pedido 1mL para 1g), o presente pedido apresenta apenas um processo simples, onde a quitosana foi dissolvida em uma solução de 1mL de ácido acético em água destilada.

[050] O referido artigo apresenta uma complexação de polielectrólitos entre a quitosana e a goma arábica, este estágio ocorre antes da preparação da estabilização da emulsão *Pickering*. A presente invenção apresenta menos processos inseridos na obtenção de uma emulsão *Pickering* com um alto grau de estabilidade. O referido documento apresenta estabilidade de $+68.5 \pm 4.9$ mV e $+46.7 \pm 1.7$ mV, porém utiliza uma quitosana com alto grau de (DDA%) além de etapas de adicionais mostrada na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1: comparação entre a presente invenção e estado da técnica

Asma, S. et. Al. (2022)	Presente invenção
50 mL de Ac. Acético para 1 g de Quitosana, água destilada (Etapa 1)	1 mL de Ac. Acético para 1 g de Quitosana (Etapa 1)
Goma arábica dissolvida em 50 mL de água desionizada (Etapa 2)	24h de aguardo após a adição do Ac. Acético (Etapa 2)
Uso da metodologia gota a gota com usode agitação (800 rpm) (Etapa 3)	Produção de <i>Pickering</i> / Potencial Zeta +71 mV
Ajuste de pH (Etapa 4)	X
Produção de <i>Pickering</i> / Potencial Zeta de +68.5 mV	X

[051] É possível observar, que o referido artigo apesar de alcançar uma boa estabilidade, faz uso de muitos recursos, tanto de equipamentos, quanto de reagentes e ainda apresenta uma metodologia complexa quando comparada com a presente invenção, tendo em vista que, temos uma proposta de estabilização de *Pickering* com quitosana utilizando apenas uma quantidade mínima de um ácido fraco (Ac. Acético), sem

agitação, e apenas com uso de água destilada (período de 24 h), além disso, está simplicidade na execução leva a diminuição de recursos e menos danos ambientais atrelado ao processo.

[052] É evidenciado que no processo de polielectrólitos usado pelo autor do artigo é consumido dois tipos de água (água desionizada e água destilada), pensando em uma aplicação direta, seria um custo a mais para implementar essa metodologia em um processo industrial, visto que a produção de água deionizada tem um custo processual elevado, por se trata de uma água com grau de pureza maior, já que são retirados íons por meio de eletrodos.

[053] A presente invenção apresenta apenas o uso de água destilada envolvida em todo processo, tanto na preparação da solução de quitosana como na fabricação da emulsão *Pickering*. Essa característica contribui para uma abordagem inovadora, além é claro, de reduzir os custos com energia colaborando para uma economia sustentável.

[054] O uso das Emulsões de *Pickering* de óleos essenciais é bastante difundido, no entanto, o que a presente invenção ressalta que são realizadas diversas formas de alcançar uma maior estabilidade possível, e por esse motivo, o uso de equipamentos e aditivos nocivos ao meio ambiente tem se tornado muito comum e difundido.

[055] O desafio foi alcançar uma alta estabilidade em uma emulsão de *Pickering* fazendo uso de poucas matérias primas adicionais, tornando o processo mais simples e menos custoso, aumentando assim, tanto a viabilidade econômica do processo como a questões de caráter sustentável e ecologicamente correto.

[056] Além disso, a presente invenção otimizou os compostos ativos do óleo de *Melaleuca alternifolia* por meio da emulsão de *Pickering*, a qual apresentou alta estabilidade e ação antimicrobiana, promissora para um veículo com diversas aplicabilidades, especialmente contra o vírus

SARS-CoV-2. Os ativos do óleo de *Melaleuca alternifolia* conseguiram inativar o SARS-CoV-2 de forma imediata, mostrando que a estabilização foi eficaz e o processo é altamente reprodutivo.

[057] Tal fato é relevante, pois demonstra que esse sistema tem uma ação eficiente contra novos microrganismos que estão surgindo, sendo potencial para áreas diversas, especialmente limpeza de superfícies altamente contaminadas, como transportes públicos e hospitais.

[058] As vantagens da invenção serão evidentes na descrição da invenção fornecida neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[059] A presente invenção tem por objetivo o desenvolvimento de emulsões de *Pickering* antimicrobianas estabilizadas por partículas sólidas de quitosana adsorvidas na interface óleo/água.

[060] Particularmente, as emulsões apresentam uma fase de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMa) dispersa em uma fase aquosa, estabilizadas com micro e nanopartículas de quitosana (Qs).

[061] Em uma primeira concretização, a presente invenção revela um método para preparação de uma emulsão contendo um óleo essencial como ingrediente ativo, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- (i) preparar uma dispersão de quitosana em solução ácida com ácido acético;
- (ii) misturar a suspensão de quitosana e óleo essencial;
- (iii) homogeneizar a emulsão.

[062] Em uma segunda concretização, a presente invenção revela ainda que óleo essencial é um óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

[063] Em uma terceira concretização, a presente invenção

revela ainda que o ácido acético utilizado na etapa (i) estar em uma concentração de 0,1% a 10%, preferencialmente de 0,5% a 5%, ainda mais preferencialmente 1%.

[064] Em uma quarta concretização, a presente invenção revela ainda que a dispersão de quitosana utilizada na etapa (i) possuir grau de desacetilação (DDA%) de 70% a 85%, preferivelmente de 75% a 80%.

[065] Em uma quinta concretização, a presente invenção revela ainda que a suspensão de quitosana utilizada na etapa (ii) apresenta de 0,1% a 1,0% % em p/v, preferivelmente de 0,2% a 0,7% em p/v, mais preferivelmente 0,5% em p/v.

[066] Em uma sexta concretização, a presente invenção revela uma emulsão *Pickering* preparada através de método como definido anteriormente.

[067] Em uma sétima concretização, a presente invenção revela uma emulsão *Pickering* compreendendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* como ingrediente ativo e estabilizantes, em que o estabilizante é micropartículas de quitosana.

[068] Em uma oitava concretização, a presente invenção revela ainda que a Emulsão *Pickering* pode ser usada como antibiótico contra bactérias, fungos e vírus.

[069] Em uma oitava concretização, a presente invenção revela o uso de uma emulsão *Pickering* preparada através de método como definido anteriormente como antibiótico contra bactérias, fungos e vírus.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[070] Figura 1: Descreve as emulsões analisadas por Microscopia Óptica (M.O). As emulsões de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em água estabilizadas com micro e nanopartículas de quitosana não sofrem cremação, sedimentação durante 30 dias de armazenamento.

Os diâmetros médios foram $16,66 \pm 5,82$ (emulsão 1) $18,08 \pm 6,56$ (emulsão 2). Os diâmetros são estatisticamente semelhantes, logo a quantidade de água não teve interferência no tamanho da gota, evidenciado que as formas de preparação das emulsões foram adequadas para a constituição de microgotas estáveis. Logo as gotículas nas emulsões são atribuídas ao mecanismo de emulsificação caracterizado pela adsorção das partículas de quitosana na interface óleo e água levando a cobertura superficial das gotas evitando as coalescências e dessa forma contribuindo para alta estabilidade das emulsões.

[071] Figura 2: Apresenta resultado de fenômeno de instabilidade. As emulsões apresentaram transparência um indicativo de alta estabilidade e de fácil aplicabilidade.

[072] Figura 3: Descreve a análise de FT-Raman – MultiRaman (Bruker Optics, EUA) com comprimento de onda de 1064 nm e laser de potência de 150 W.

[073] Figura 4: Descreve a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de diamante de refletância total atenuada (ATR).

[074] Figura 5: Descreve a análise antimicrobiana de Cepas Gram-Positiva e Gram-Negativa (*E. coli*). O halo de inibição contra as bactérias *E. coli* foi $2,6 \pm 0,2$ cm e $2,5 \pm 0,1$ cm (Emulsões de *Melaleuca alternifolia* 1 e 2) e óleo de *Melaleuca alternifolia* com $4,4 \pm 0,2$ cm respectivamente. Sendo que estes valores são superiores aos resultados observados para os agentes antimicrobianos hipoclorito de sódio e Lysoform® com halos de $2,3 \pm 0,2$ cm respectivamente, comercializados no mercado atualmente e amplamente utilizados.

[075] Figura 6: Descreve a análise Antimicrobiana de Cepas Gram-Positiva e Gram-Negativa (*S. Aureus*). O halo de inibição contra as bactérias *S. aureus* foi igual a $3,0 \pm 0,2$ cm e $2,7 \pm 0,1$ cm (Emulsões de

Melaleuca alternifolia 1 e 2) e óleo de *Melaleuca alternifolia* com $4,5 \pm 0,2$ cm. Sendo que estes valores são superiores aos resultados observados para os agentes antimicrobianos hipoclorito de sódio e Lysoform[®] com halos de $2,1 \pm 0,2$ cm e $2,7 \pm 0,1$ cm, respectivamente.

[076] Figura 7: Descreve o ensaio fúngico (*Penicillium sp*). Halo de inibição contra fungos (*Penicillium sp*) foi detectado com diâmetro $5,1 \pm 0,2$ cm e $4,5 \pm 0,1$ cm. Valores bem superiores aos resultados observados para outras emulsões de caráter antimicrobiano.

[077] Figura 8: Descreve a análise de dispersividade com as emulsões de *Pickering* com partícula de quitosana.

[078] Figura 9: Microscopia Óptica de fluorescência da emulsão de *Melaleuca alternifolia* estabilizada com micropartícula de quitosana. Escala de barras = 100 μ m.

[079] Figura 10: Potencial Zeta das emulsões de *Pickering* estabilizada por partícula de quitosana.

[080] Figura 11: Resultado do ensaio Sars-Cov-2.

[081] Figura 12: O diâmetro hidrodinâmico dos micropartículas e nanopartículas da solução de quitosana utilizada na fabricação das Emulsões de *Pickering*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[082] Preliminarmente, ressalta-se que a descrição que se segue partirá de uma concretização preferencial da invenção. Como ficará evidente para qualquer técnico no assunto, no entanto, a invenção não está limitada a essa concretização específica.

[083] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. A terminologia utilizada na descrição da invenção tem finalidade

de descrever concretizações particulares somente, e não tem a intenção de limitar o escopo dos ensinamentos. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[084] A presente invenção prevê um método para preparação de emulsões *Pickering* do tipo O/A contendo as gotículas de óleo essencial (MaEO) estabilizadas no meio aquosos usando partículas de quitosana sem modificação química e sem adição de reagentes nocivos ao meio ambiente.

[085] A presente invenção refere-se a um novo método para fabricar emulsão *Pickering* de óleo em água com alta estabilidade e excelentes atividades biológicas contra uma série de patógenos.

[086] A fase oleosa contém óleo essencial de MaEO composto majoritariamente por terpenos e terpenoides. Essa emulsão *Pickering* pode ser usada como um transportador de um ingrediente ativo em um cosmético, composição farmacêutica, agentes de limpeza, dependendo do objetivo do fabricante.

[087] A presente invenção fornece um novo método para preparação de emulsões *Pickering* contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree).

[088] Especificamente, a presente invenção refere-se a um processo para formar composição de emulsões de *Pickering* com a fase oleosas contendo óleo essencial usando uma suspensão com quitosana (biopolímero) com grau de desacetilação (DDA% 75-80%), com o uso de um ácido de baixa toxicidade em pouca quantidade (1% de Ác. Acético).

[089] O novo método revelado pela presente invenção compreende as seguintes etapas:

(1) preparo da dispersão de quitosana em solução ácida com ácido acético;

(2) mistura da suspensão de quitosana (estabilizante polimérico de quitosana (0,5 % em p/v)) e OEMa (30%);

(3) homogeneizar a emulsão.

[090] O ácido acético utilizado na etapa (1) pode estar na concentração de 0,1% a 10%, preferencialmente de 0,5% a 5%, ainda mais preferencialmente 1%.

[091] Partículas comumente usadas em emulsões de *Pickering* incluem grupos de polissacarídeos, proteínas e outras partículas sólidas

[092] Partículas usadas em emulsões de *Pickering* baseadas em polissacarídeos incluem amido, nanocristais de amido, quitosana, nanocristais de celulose, nanofibrilas de celulose e -ciclodextrina, enquanto aquelas em emulsões de *Pickering* baseadas em proteínas incluem soro de leite, zeína, entre outras. Outras partículas comumente usadas como estabilizadores de emulsão de *Pickering* incluem nanopartículas de sílica, nanopartículas de hidroxiapatita sintética (HAp) e nanopartículas de TiO₂.

[093] A dispersão de quitosana utilizada na etapa (1) possui grau de desacetilação (DDA%) de 70% a 85%, preferivelmente de 75% a 80%.

[094] Na etapa (2), a suspensão de quitosana apresenta de 0,1% a 1,0% % em p/v, preferivelmente de 0,2% a 0,7% em p/v, mais preferivelmente 0,5% em p/v.

[095] Em relação ao OEMa utilizado na etapa (2), o mesmo é composto por terpineno-4-ol (41%), γ -terpineno (21%), α -terpineno (9%) α -terpineol (4%), terpinoleno (3%), α -pineno (3%) e p-cimeno (3%). O mesmo se apresenta em uma concentração na faixa de 10% a 50%,

preferencialmente 20% a 40%, mais preferencialmente 30%.

Exemplo 1 - Preparação das emulsões de *Pickering*

[096] 1 - Fase de óleo: OEMa (30%).

[097] 2 - Fase Aquosa: Água (70 %),

[098] 3 - Preparação da suspensão partículas de quitosana: Quitosana (0,5% em p/v) suspendida em uma solução aquosa de ácido acético (1% v/v) está suspensão é armazenada por 24h e depois utilizada no processo de preparação da *Pickering*.

[099] Parâmetros de Processos da Preparação das Emulsões de *Pickering*: Rotação: 12RPM e Tempo: 5 Minutos

[100] A suspensão aquosa de quitosana (0,5% p/v) é misturada com OEMa (30%) homogeneizada em Ultra-Turrax Blender, modelo IKA T25 (IKA Werke, Staufen, Alemanha), utilizou-se rotação (12 rpm) por 5 minutos com o intuito de causar uma maior dispersão das micropartículas de quitosana, levando a um sistema homogêneo.

Exemplo 2 - Microscopia Óptica

[101] As gotículas de óleo nas emulsões (óleo em água) foram analisadas usando um microscópio óptico Leica DM KM (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Uma gota de emulsão foi adicionada a uma lâmina de vidro e imagens representativas foram obtidas nos dias 0 e 30 (armazenamento estático). Os diâmetros das gotas foram medidos usando o software ImageJ como um número médio de 120 gotas.

[102] Os resultados podem ser vistos na figura 1.

Exemplo 3 - Estabilidade de Armazenamento de Emulsão

[103] As amostras foram adicionadas a tubos e armazenadas à temperatura ambiente. A estabilidade das emulsões foi avaliada através do fenômeno de instabilidade (cremeação e sedimentação) avaliado em duplicatas em 0 – 30 dias com auxílio e equações baseadas no comportamento visual.

[104] O índice de cremação (IC), quando presente, é calculado utilizando a Equação (1), em que H_{total} e H_{creme} são as alturas totais da emulsão e da camada de creme, respectivamente. O índice de estabilidade é calculado de acordo com a equação 1: $CI = \frac{H_{cream}}{H_{total}} \times 100$.

[105] As emulsões não apresentaram nenhum fenômeno de instabilidade, logo foi 100% estáveis. As emulsões apresentaram transparência um indicativo de alta estabilidade e de fácil aplicabilidade (ver figura 2)

[106] Pela ausência dos fenômenos de instabilidade, o valor da estabilidade foi 100%.

Exemplo 4 - Espectroscopia Raman de Transformada de Fourier (FT-Raman)

[107] As emulsões foram analisadas com um FT-Raman – MultiRaman (Bruker Optics, EUA) com comprimento de onda de 1064 nm e laser de potência de 150 W. A aquisição de dados foi realizada em 600-4000 cm^{-1} , sendo 64 varreduras e resolução espectral de 2 cm^{-1} (ver figura 3).

Exemplo 5 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

[108] Foram usadas duas emulsões chamadas 4 e 5 com diferentes parâmetros de processos e (FTIR). A emulsão de melaleuca com quitosana (4) apresentou melhores resultados.

[109] A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com acessório de diamante de refletância total atenuada (ATR) foi realizada no equipamento Frontier 94942 (PerkinElmer Inc., Massachusetts, EUA). Os espectros foram coletados com resolução espectral de 4 cm^{-1} , 64 varreduras, de 4000 a 400 cm^{-1} (ver figura 4).

Exemplo 6 - Zona de Inibição de Bactérias

[110] As culturas bacterianas de estoque foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton com 15% de glicerol e armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. As culturas em estoque foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (Oxoid) e inoculadas a 37°C por 24 h.

[111] A cultura de inoculação (por 24 h com turbidez equivalente a 0,5 Mc Farland, concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) preparou as suspensões das cepas bacterianas isoladas e padrão. Em seguida, 30 mL de ágar foram derretidos e resfriados a $48 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, 500 μL do inóculo bacteriano a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ foram misturados ao ágar.

[112] Em seguida, essa mistura foi transferida para uma placa de Petri. Após a solidificação, foi feito um orifício de 0,9 cm de diâmetro no meio das placas e a emulsão (0,2 - 0,5 mL) foi alocada neste orifício.

[113] Finalmente, as placas inoculadas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foi avaliado o aparecimento de halos de inibição ao redor do orifício com o produto. Esses halos de inibição correspondem ao diâmetro de uma zona de inibição mesclada ao redor das amostras

antimicrobianas. Como controle, foram utilizados sanitizantes comerciais comuns amplamente utilizados (hipoclorito e Lysoform®) (Figuras 5 e 6).

Exemplo 7 - Ensaio de Contagem de Formação de Colônias de Bactérias

[114] Para a contagem de bactérias, 100 µL de um inóculo de bactéria estoque previamente ajustado (105 UFC.mL^{-1} em Nutrient Broth, HIMEDIA, Índia) foi misturado com 9,9 mL de caldo nutriente (HIMEDIA, Índia) e 100 µL do óleo essencial ou emulsão. As amostras foram incubadas a $36 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h com 85% de umidade. Em seguida, 100 µL das amostras incubadas foram misturados com 9,9 mL de meio nutriente de ágar (HIMEDIA, Índia), despejados em placas de Petri (com 90 mm de diâmetro) e incubados a $36 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h com 85 % de umidade.

[115] A viabilidade dos inóculos foi confirmada através de um método *pour-plate* em ágar nutriente como controle positivo. O número de unidades formadoras de contagem foi medido com o software ImageJ. Os testes foram realizados em triplicata.

[116] A contagem bacteriana total (em UFC.mL^{-1}) foi determinada pela multiplicação do número de colônias bacterianas contadas nas placas pelo fator de diluição (10^{-4}) do inóculo bacteriano plaqueado.

Exemplo 8 - Ensaio Fungicidas

[117] As cepas de fungos do gênero *Penicillium sp* foram isoladas no laboratório após exposição de placa de petri contendo agar potato destrose, seguida de crescimento em estufa a 25°C por 5 dias segundo metodologia modificada da RE09 e 2003 da ANVISA.

[118] O Fungo cultivado foi suspenso em solução fisiológica estéril, dessa solução foi utilizada 10 µl nas placas de petri contendo agar potato destrose por *spread plate*, foi utilizado 100 µL das emulsões como fator inibidor, logo em seguida as placas de petri (agar potato destrose) contendo as emulsões e as cepas foram incubadas em estufa a 25 °C por 5 dias.

[119] Ao término do quinto dia, foram observados halos de inibição fungicida com diâmetro de $5,1 \pm 0,2$ cm e $4,5 \pm 0,1$ cm com desvio padrão de 0,8 cm contra o *Penicillium sp* (Figura 7).

Exemplo 9 - Potencial Zeta

[120] O potencial zeta foi estimado pelo modelo de Smoluchowski a partir de medidas da mobilidade eletroforética das nanopartículas utilizando Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments. O tempo de leitura para obtenção dos dados de potencial Zeta foi de 10 s, e as medidas foram realizadas em triplicata.

[121] Como anteriormente dito, a presente invenção proposta apresenta menos etapas de processo, com uso de pouco material e com potencial Zeta superior (+71mV) ou seja, alta estabilidade ao longo do tempo (ver figura 10).

Exemplo 10 - Dispersão de luz dinâmica (DLS)

[122] A distribuição do diâmetro das partículas foi registrada usando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com um ângulo de espalhamento de 90°. O Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, U.K.) foi o equipamento utilizado para a caracterização do DLS. Aliquotas das suspensões (100 µL) foram suspensas em água destilada (2

mL), e cada amostra foi analisada em duplicata.

[123] A Figura abaixo obtida no DLS apresenta o resultado do diâmetro hidrodinâmico das micropartículas e nanopartículas da solução de quitosana utilizada na preparação das emulsões de *Pickering* de melaleuca estabilizada com quitosana (Figura 12).

Medições do tamanho das partículas das emulsões Pickering

[124] A distribuição do diâmetro das partículas foi registrada usando a técnica de análise de partícula por Laser. Utilizando um analisador de partículas por difração a laser (Bettersize ST, Instruments Ltd., China) com uma faixa de 0,10-1000 μm) As amostras de emulsão foram adicionadas no compartimento de medição (600 mL de água) até se atingir um nível de obscurecimento de 5-10%. Cada medição foi repetida em triplicado (ver figura 8).

Exemplo 11 - Análise de microscopia óptica de fluorescência

[125] Foram realizados 2 procedimentos simples e de baixo custo, em que a suspensão de quitosana, feita com 0,5% de ácido acético, é misturado ao óleo essencial. Assim, ocorre, por efeitos físico-químicos, uma estabilização eletrostática devido a interações químicas entre os componentes.

[126] Foi realizada uma análise de microscopia óptica de fluorescência (Figura 9), em que observamos partículas bem dispersas e separadas, onde o vermelho congo foi adsorvido pela quitosana, criando uma diferença de sinal de fluorescência vermelha detectado pelo microscópio (MICHELS; BÜNTZOW, 2010).

[127] Os exemplos citados a seguir são meramente ilustrativos, devendo ser empregados somente para uma melhor

compreensão dos desenvolvimentos constantes na presente invenção, não devendo, contudo, serem utilizados com o intuito de limitar os objetos descritos.

Exemplo 12 – Ensaio SARS-CoV-2

[128] Os kits de teste rápido de antígeno foram fornecidos pelo teste rápido Panbio™ COVID-19 Ag (Abbott, EUA).

[129] A metodologia de Teste Rápido de Antígeno aplicada nesta investigação detecta a desnaturação ou degradação de proteínas por meio da ausência de interação entre antígeno-anticorpo, um indicador da inviabilidade do vírus. O óleo essencial de melaleuca e as emulsões *Pickering* interrompem o capsídeo viral tornando-o inviável, produzindo fragmentos do vírus, levando o vírus a inativação.

[130] Preliminarmente, amostras nasofaríngeas coletadas dos pacientes foram suspensas em soro fisiológico e testadas para SARS-CoV-2 no diagnóstico de rotina do laboratório, pelo método RT-qPCR (transcrição reversa em tempo real - reação em cadeia da polimerase) e armazenadas no biorrepositório do Adolfo Instituto Lutz - Centro Laboratorial Regional de Santo André. Para isso, 100 µL de uma amostra positiva foram diluídos em 100 µL de soro fisiológico e analisados pelo Antígeno Rápido. Teste utilizando um swab para emergir nesta diluição que foi transferido para o tubo do *kit* contendo 300 µL do tampão e cinco gotas foram adicionadas no dispositivo, de acordo com as instruções do fabricante, para confirmar a integridade da proteína viral na amostra.

[131] Após a obtenção do resultado positivo, foi preparada uma mistura de 100 µL da mesma amostra positiva para SARS-CoV-2 e 100 µL de um óleo essencial de melaleuca ou de emulsões de *Pickering*, e as amostras foram testadas em diferentes tempos de contato. O tempo de

teste foi de (0, 5, 10, 15, 20). O óleo essencial de melaleuca e as *Pickerings* apresentaram resultados satisfatórios para inativação do vírus SARS-CoV-2 (Figura 11).

[132] Declaração de Ética: Os testes antivirais contra o SARS-CoV-2 foram realizados seguindo as normas padrão aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do ABC e Instituto Adolfo Lutz CAAE: 49573421.2.3001.0059, e pelo Conselho Técnico-Científico do Instituto Adolfo Lutz, CTC 18-N/2021. Todos os procedimentos seguiram as normas de biossegurança do Instituto Adolfo Lutz do Centro Regional de Laboratórios de Santo André.

Referências

[133] ASMA Sharkawy, Filomena Barreiro, Alírio Rodrigues, Pickering emulsions stabilized with chitosan/gum Arabic particles: Effect of chitosan degree of deacetylation on the physicochemical properties and cannabidiol (CBD) topical delivery, **Journal of Molecular Liquids**, Volume 355, 2022.

[134] AZIZ, Z. A. A. et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100–1110, 2018.

[135] Xieru Bao, Jie Wu, Guanghui Ma. Sprayed Pickering emulsion with high antibacterial activity for wound healing. **Progress in Natural Science:Materials International** 30 (2020) 669–676.

[136] BIDRA, A. S. et al. Rapid In-Vitro Inactivation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Using Povidone- Iodine Oral Antiseptic Rinse. **Journal of Prosthodontics**, v. 29, n. 6, p. 529–533, 2020.

- [137] Cahyana, Y.; Putri, Y.S.E.; Solihah, D.S.; Lutfi, F.S.; Alqurashi, R.M.; Marta, H. Pickering Emulsions as Vehicles for Bioactive Compounds from Essential Oils. **Molecules** 2022, 27, 7872.
- [138] C. F. Carson, K. A. Hammer, and T. V. Riley. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, Jan. 2006, p. 50–62
- [139] D. WU, L. Zhu, Y. Li, X. Zhang, S. Xu, G. Yang, T. Delair, Chitosan- based Colloidal Polyelectrolyte Complexes for Drug Delivery: A Review, **Carbohydr. Polym.** 238 (2020) 116126.
- [140] E. DICKINSON Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions, **Trends Food Sci. Technol.** 24 (1) (2012) 4–12.
- [141] E.S. DE ALVARENGA, C. Pereira de Oliveira, C. Roberto Bellato, An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan, **Carbohydr. Polym.** 80 (4) (2010) 1155–1160
- [142] FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, n. spe, p. 1–9, dez. 2015.
- [143] GAROZZO, A. et al. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. **Antiviral Research**, v. 89, n. 1, p. 83–88, jan. 2011.
- [144] GIORDANI, C. et al. Interaction of Tea Tree Oil with Model and Cellular Membranes. p. 4581–4588, 2006.
- [145] GORDON, D. E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, v. 583, n. 7816, p. 459–468, jul. 2020.
- [146] Greiciele da S. Ferreira, Daniel J. da Silva, Derval S. Rosa. Super stable *Melaleuca alternifolia* essential oil *Pickering* emulsions

stabilized with cellulose nanofibrils: **Rheological aspects**. **Journal of Molecular Liquids** Volume 372, 15 February 2023.

[147] KAUSHIK, A. K. et al. Electrochemical SARS-CoV - 2 Sensing at Point- of-Care and Arti fi cial Intelligence for Intelligent COVID-19 Management. 2020.

[148] L. FAN, H. Yang, J. Yang, M. Peng, J. Hu, Carbohydr. Polym. 146 (2016) 427–434; H. Liu, C. Wang, C. Li, Y. Qin, Z. Wang, F. Yang, Z. Li, J. Wang, **RSC Adv.** **8** (2018) 7533–7549.

[149] LI, W. R. et al. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8865–8875, 2016.

[150] LOVEDAY, E. K. et al. and Structure. p. 1–11, 2021.

[151] MERONI, G. et al. antibiotics In Vitro Efficacy of Essential Oils from *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis*, Antibacterial Agents Against Canine *Staphylococcus Pseudintermedius* Strains. 2020.

[152] MEYERS, C. et al. Ethanol and isopropanol inactivation of human coronavirus on hard surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 107, p. 45–49, 2021.

[153] M.H. ASFOUR, H. Elmotasem, D.M. Mostafa, A.A.A. Salama, **Int. J. Pharm.** 534 (2017) 325–338.

[154] M. RAYNER, D. Marku, M. Eriksson, M. Sjöö, P. Dejmeck, M. Wahlgren, Biomassbased particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications, **Colloids Surf., A** 458 (2014) 48–62.

[155] MONDELLO, F. et al. Terpinen-4-ol, the Main Bioactive Component of Tea Tree Oil, as an Innovative Antimicrobial Agent against *Legionella pneumophila*. **Pathogens**, v. 11, n. 6, p. 682, 2022.

- [156] MONGE, F. A. et al. Highly Effective Inactivation of SARS-CoV-2 by Conjugated Polymers and Oligomers. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 50, p. 55688–55695, 16 dez. 2020.
- [157] NASCIMENTO, D. D. O.; ASSOCIADOS, A. **Br 102016024625-3 a2**. [s.l: s.n.].
- [158] OLIVA, A. et al. High Potency of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2584, 9 out. 2018.
- [159] PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: Formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 1, p. 155–162, 2014.
- [160] POURGHANBARI, G. et al. Antiviral activity of the oseltamivir and *Melissa officinalis* L. essential oil against avian influenza A virus (H9N2). **VirusDisease**, v. 27, n. 2, p. 170–178, jun. 2016.
- [161] PUVAČA, N. et al. Use of Tea Tree Essential Oil (*Melaleuca alternifolia*) in Laying Hen's Nutrition on Performance and Egg Fatty Acid Profile as a Promising Sustainable Organic Agricultural Tool. 2020.
- [162] REIS, J. B. Brazilian Journal of health Review. p. 342–363, 2020.
- [163] ROANA, J. et al. Antifungal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil (TTO) and Its Synergy with Itraconazole or Ketoconazole against *Trichophyton rubrum*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 2, 2021.
- [164] SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 443–452, jun. 2010.

[165] SOUZA, A. G. et al. The effect of essential oil chemical structures on Pickering emulsion stabilized with cellulose nanofibrils. **Journal of Molecular Liquids**, v. 320, p. 114458, dez. 2020.

[166] TADROS, T. F. (ED.). **Emulsion Formation and Stability**. Weinheim, Germany: Wiley, 2013.

[167] TADROS, T. F. **Emulsions: Formation, Stability, Industrial Applications**. Berlin, Germany: Walter de Gruyter GmbH, 2016.

[168] TARIQ, S. et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v.134, p. 103580, set. 2019.

[169] TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p.40–53, 2013.

[170] VETERE, A. et al. Acute tea tree oil intoxication in a pet cockatiel (*Nymphicus hollandicus*): a case report. p. 6–10, 2020.

[171] WANI, A. R. et al. An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, n. October 2020, p. 104620, mar. 2021.

[172] WELCH, J. L. et al. Inactivation of Severe Acute Respiratory Coronavirus Virus 2 (SARS-CoV-2) and Diverse RNA and DNA Viruses on Three- Dimensionally Printed Surgical Mask Materials. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 42, n. 3, p. 253–260, 2021.

[173] YADALAM, P. K. et al. Antiviral Essential Oil

Components Against SARS-CoV-2 in Pre-procedural Mouth Rinses for Dental Settings During COVID-19: A Computational Study. *Frontiers in Chemistry*, v. 9, n. March, mar. 2021.

[174] ZHAI, X. et al. Inverse Pickering emulsions stabilized by carbon quantum dots: Influencing factors and their application as templates. **Chemical Engineering Journal**, v. 345, n. December 2017, p. 209–220, 2018.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparação de uma emulsão contendo um óleo essencial como ingrediente ativo, **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- (i) preparar uma dispersão de quitosana em solução ácida com ácido acético;
- (ii) misturar a suspensão de quitosana e óleo essencial;
- (iii) homogeneizar a emulsão.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do óleo essencial ser um óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato do ácido acético utilizado na etapa (1) estar em uma concentração de 0,1% a 10%, preferencialmente de 0,5% a 5%, ainda mais preferencialmente 1%.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato da dispersão de quitosana utilizada na etapa (1) possuir grau de desacetilação (DDA%) de 70% a 85%, preferivelmente de 75% a 80%.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a suspensão de quitosana utilizada na etapa (2) apresenta de 0,1% a 1,0% % em p/v, preferivelmente de 0,2% a 0,7% em p/v, mais preferivelmente 0,5% em p/v.

6. Emulsão *Pickering* **caracterizada** pelo fato de ser preparada através de método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

7. Emulsão *Pickering* **caracterizada** pelo fato de que compreende óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* como ingrediente ativo e estabilizantes, em que o estabilizante é micropartículas de quitosana.

8. Emulsão *Pickering* de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizada** pelo fato de ser para uso como antibiótico contra bactérias,

fungos e vírus.

9. Emulsão *pickering* de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de inativar o vírus SARS-CoV-2.

10. Uso de uma emulsão *pickering* preparada através de método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de como antibiótico contra bactérias, fungos e vírus.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de inativar o vírus SARS-CoV-2.

Figura 1

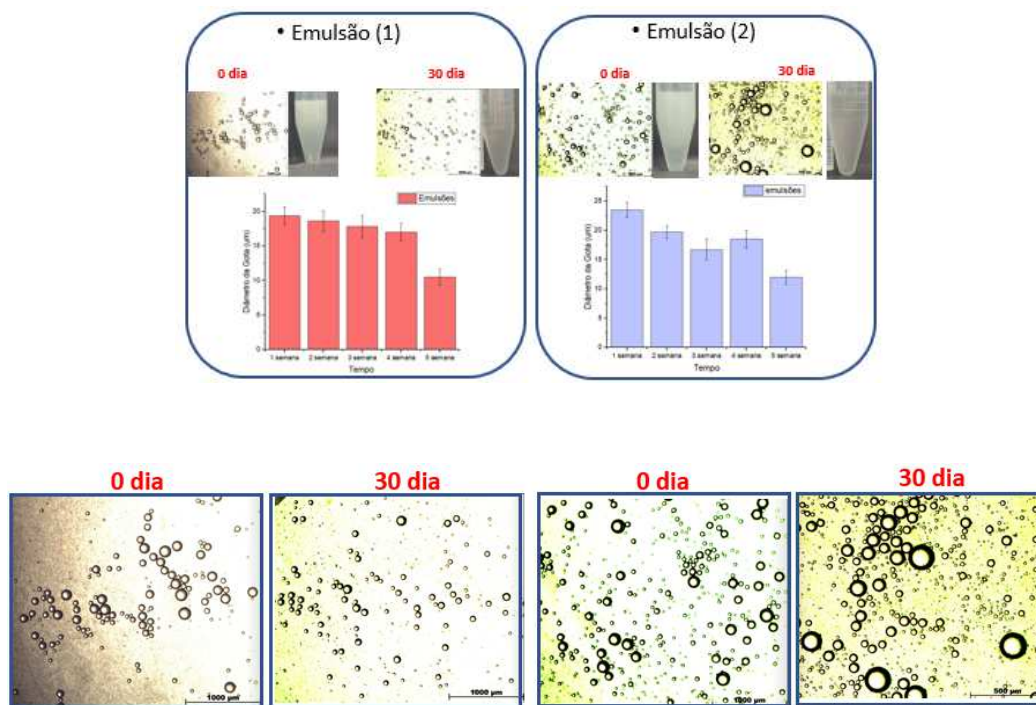


Figura 2



Figura 3

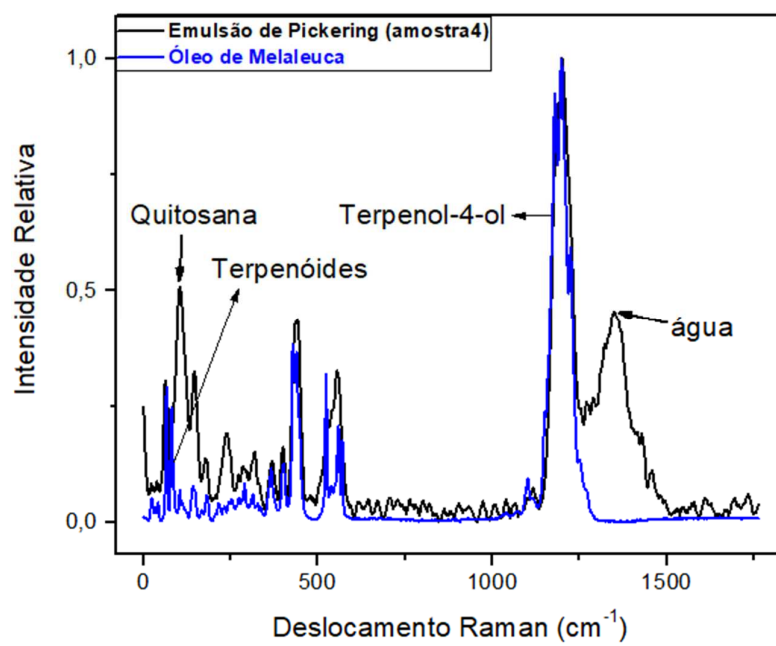


Figura 4

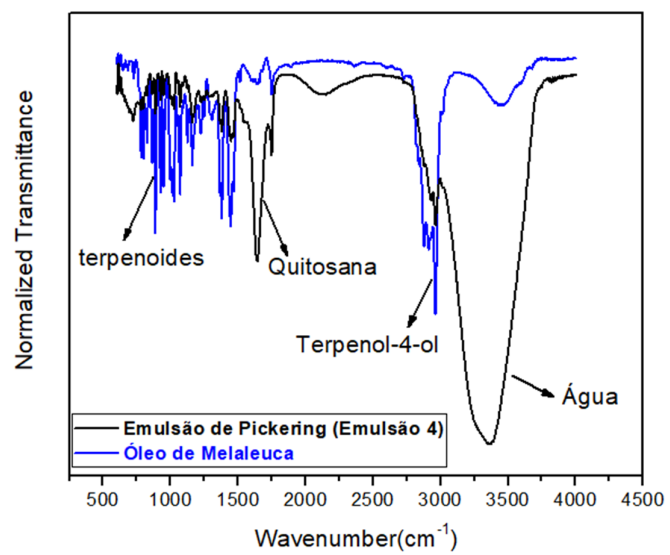


Figura 5

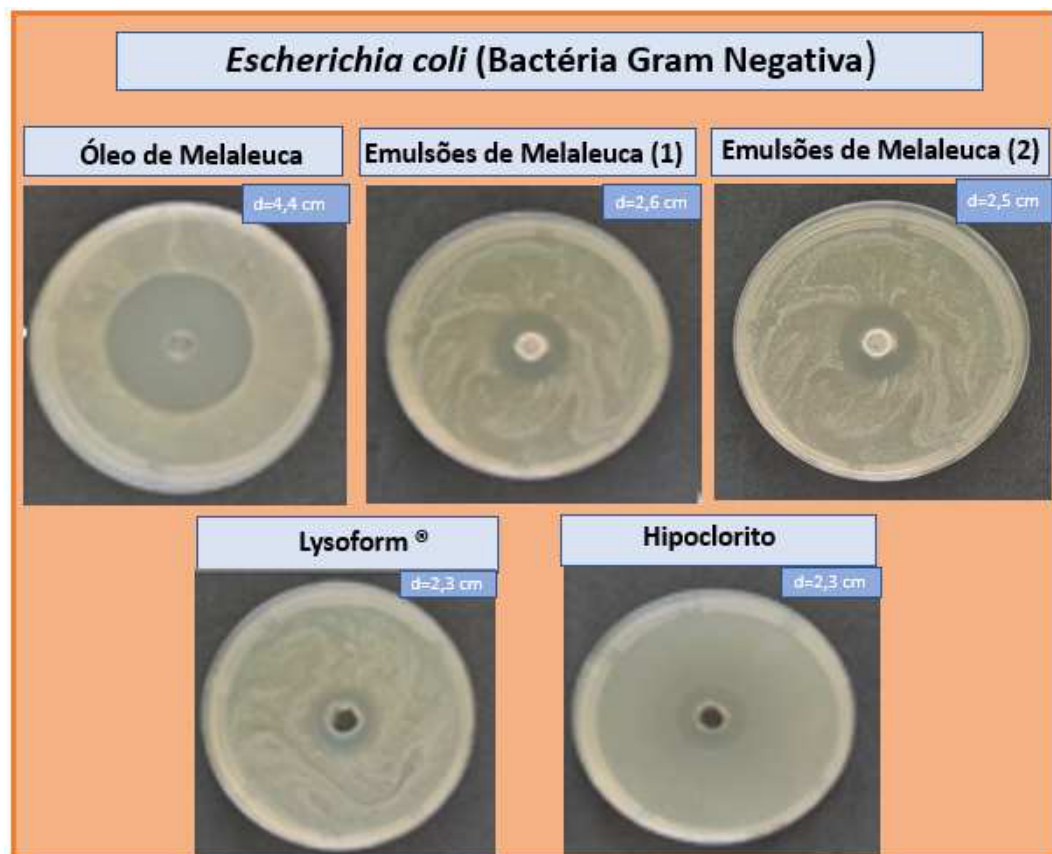


Figura 6

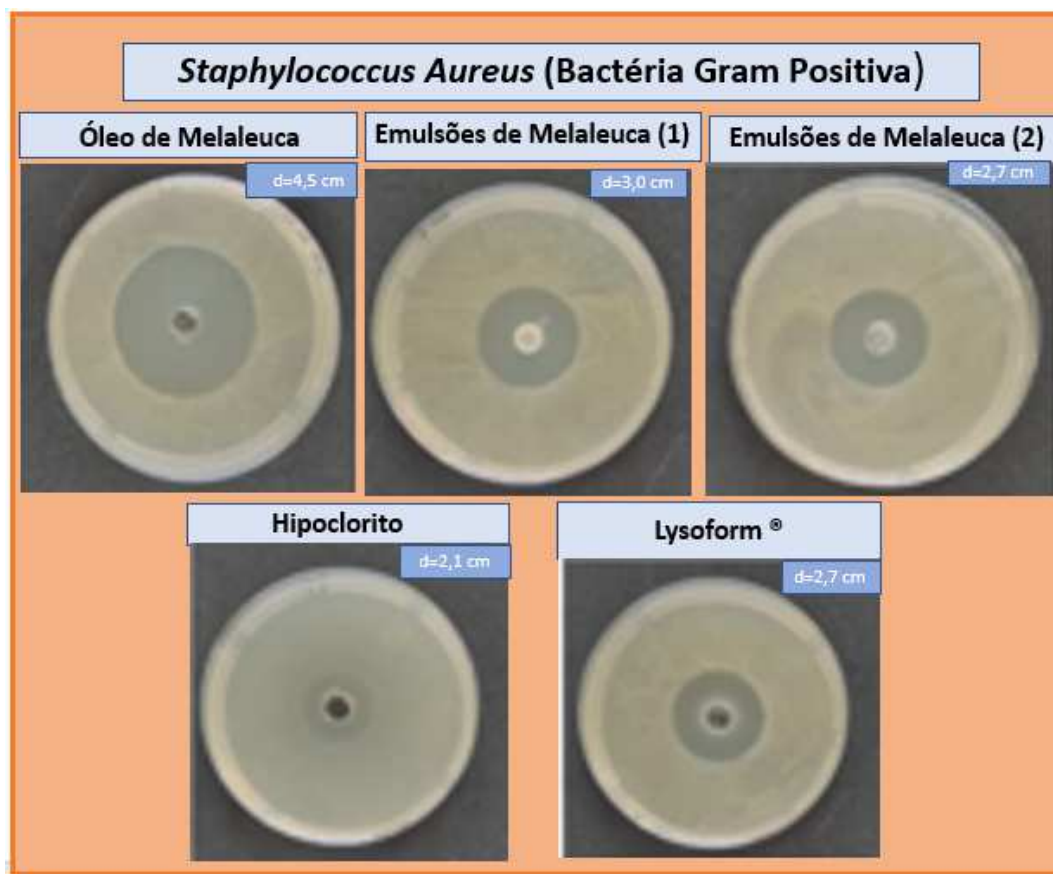


Figura 7

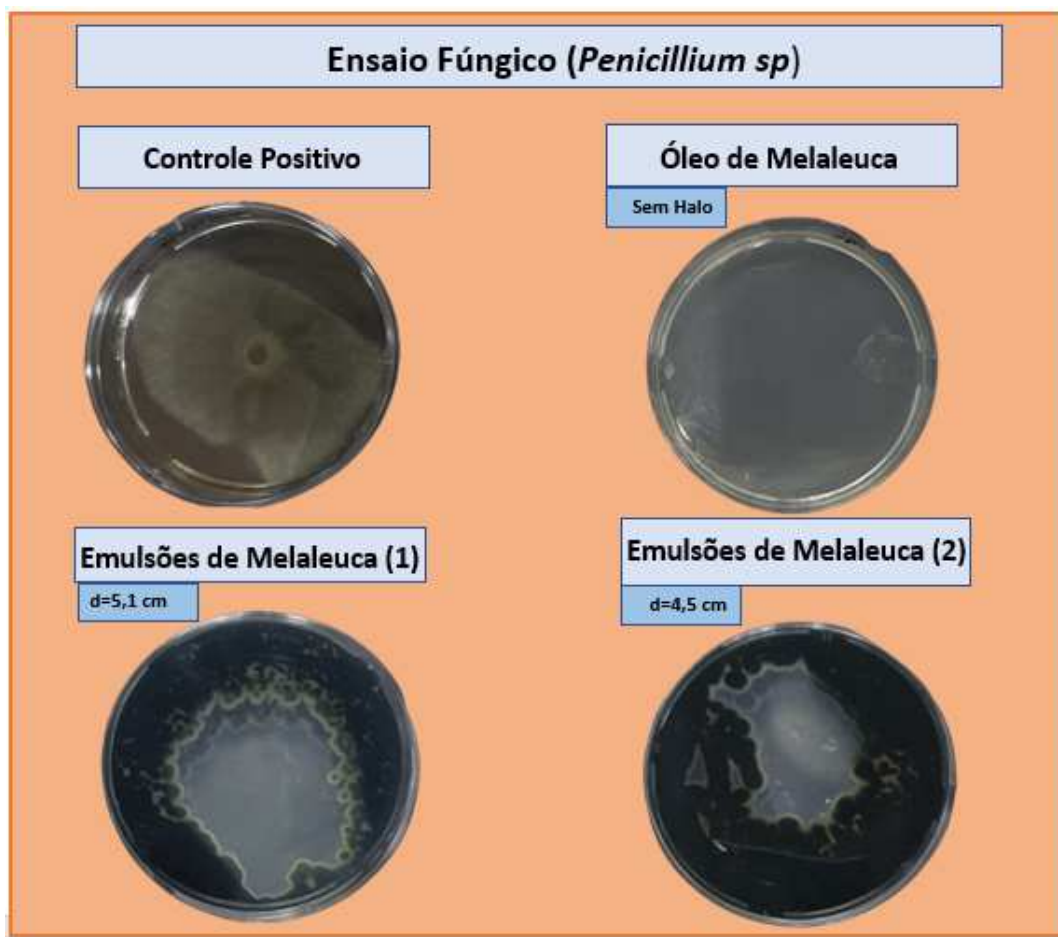


Figura 8

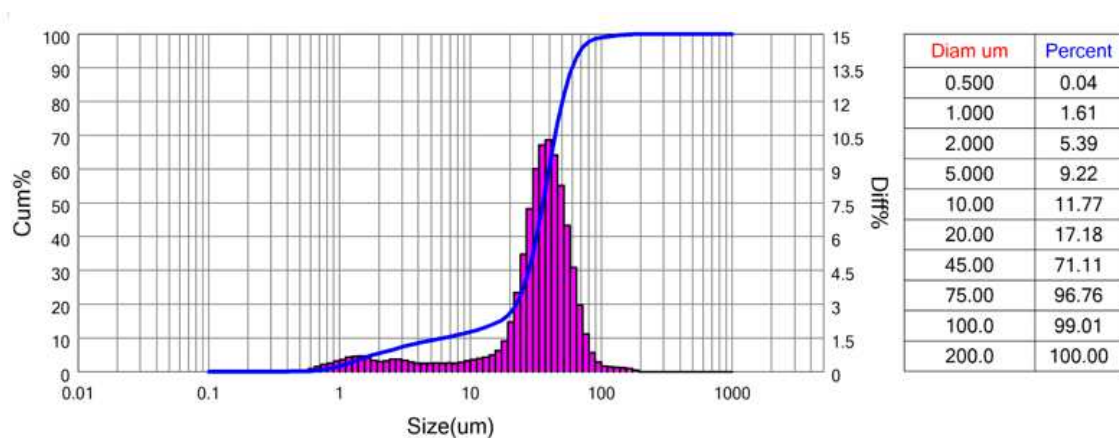
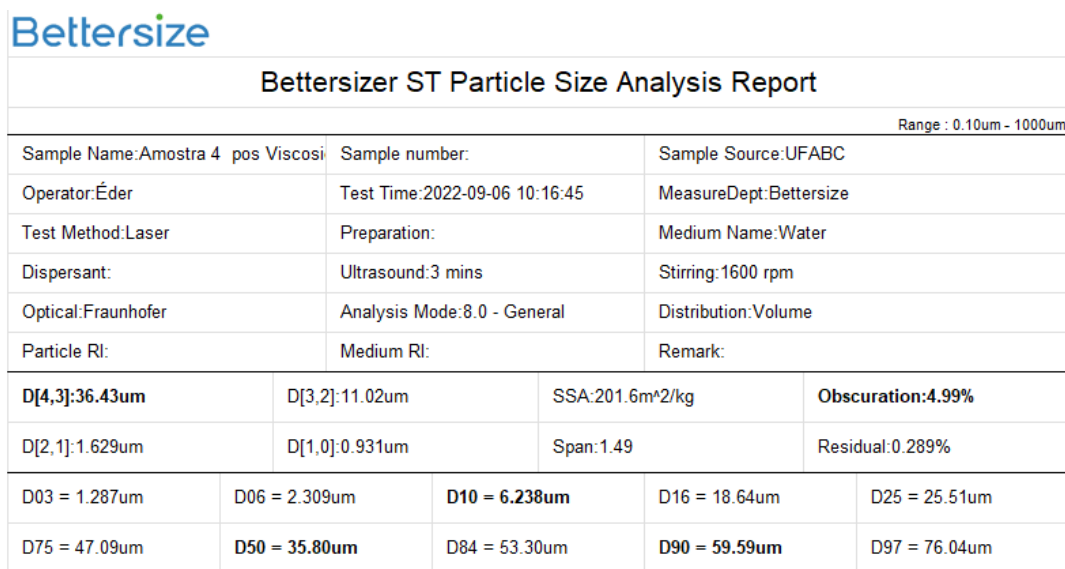


Figura 9

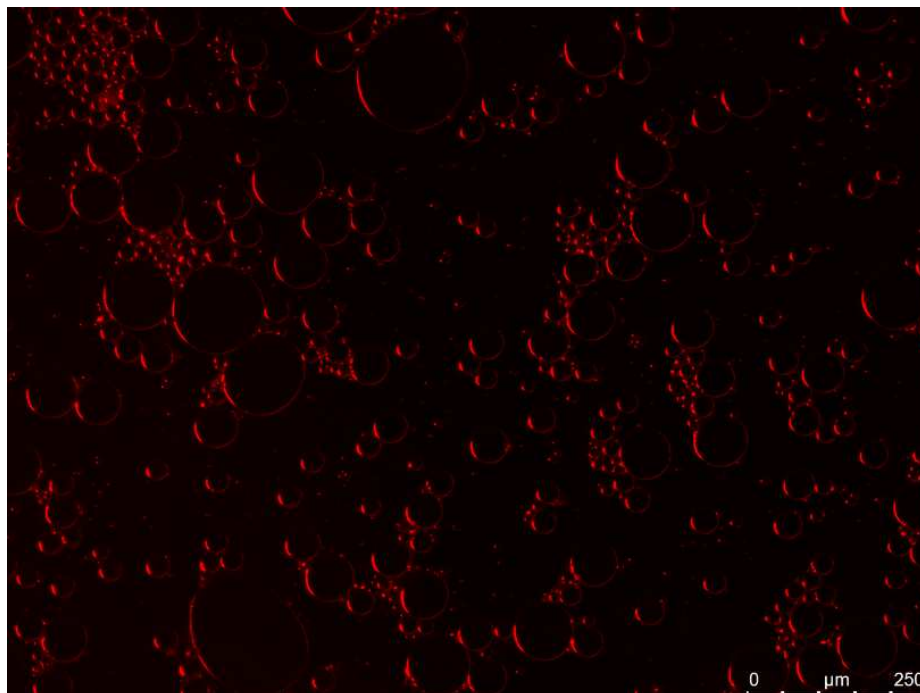


Figura 10

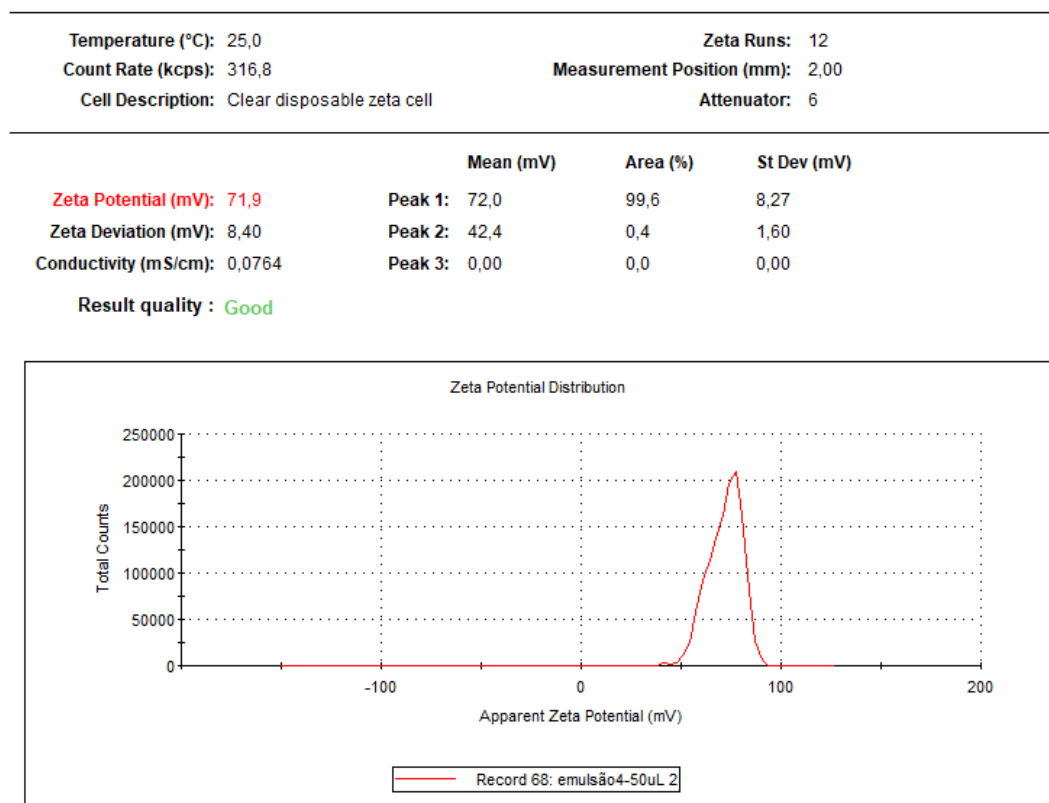


Figura 11

Resultados antivirais para a Emulsão de *Pickering* (amostra 4) e para o óleo de Melaleuca.

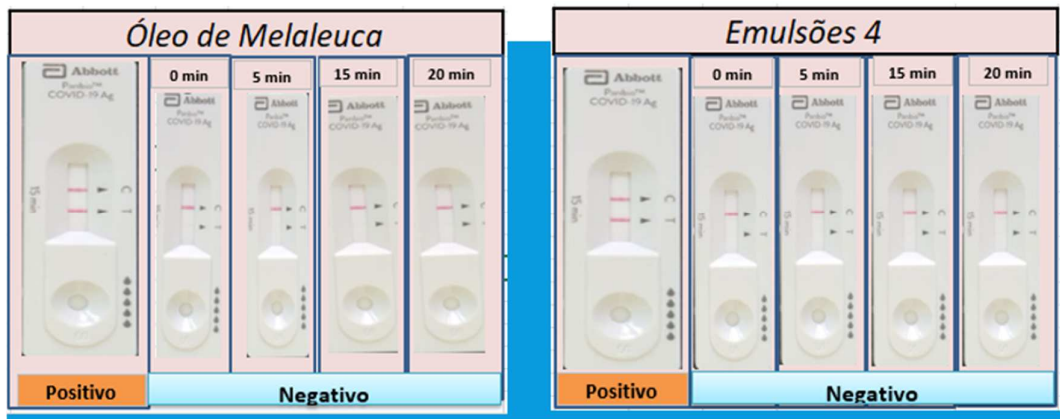
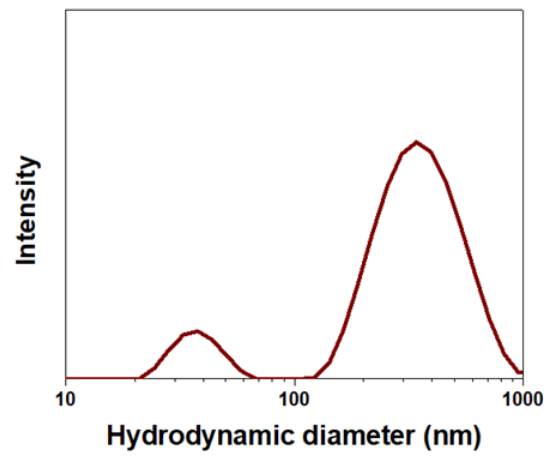


Figura 12



RESUMO**MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UMA EMULSÃO CONTENDO UM ÓLEO ESSENCIAL COMO INGREDIENTE ATIVO, EMULSÃO *PICKERING* E USO DE UMA EMULSÃO *PICKERING***

A presente invenção se refere a um método para preparação de emulsões de *Pickering* antimicrobianas estabilizadas por partículas sólidas de quitosana adsorvidas na interface óleo/água composta por matérias-primas naturais e atóxicas. As emulsões apresentam uma fase de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMa) dispersa em uma fase aquosa, estabilizadas com micro e nanopartículas de quitosana (Qs). Ademais, a emulsões apresentam atividade antibiótica contra bactérias, fungos e vírus.