



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

(21) BR 112019016189-9 A2



(22) Data do Depósito: 06/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES ANTIMICROBIANAS COMPREENDENDO COMPLEXOS DE COBRE-HIDROXIPIRONA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/351; A61K 33/34; A61K 9/00; A61P 31/04; A61P 31/06; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 06/02/2017 GB 1701944.9.

(71) **Depositante(es):** UNITED KINGDOM RESEARCH AND INNOVATION.

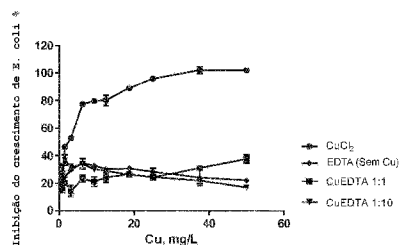
(72) **Inventor(es):** JONATHAN JOSEPH POWELL; NUNO JORGE RODRIGUES FARIA; CARLOS ANDRE PASSOS BASTOS.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018052958 de 06/02/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/141989 de 09/08/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 05/08/2019

(57) **Resumo:** São descritos agentes antibacterianos à base de cobre com base em complexos de cobre anfífilos formados entre o cobre e as hidroxipironas, tal como o maltol. Em outros aspectos, a presente invenção se refere a pomadas à base de PEG mostrando que elas são particularmente eficazes para administração tópica de complexos anfífilos de cobre. Em particular, as pomadas de PEG mostraram limitar o crescimento bacteriano, mesmo quando na ausência do agente de cobre. No entanto, este efeito bacteriostático é mostrado aqui para se tornar um verdadeiro efeito biocida quando as hidroxipironas de cobre são adicionadas ao PEG.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
"COMPOSIÇÕES ANTIMICROBIANAS COMPREENDENDO COMPLEXOS DE
COBRE-HIDROXIPIRONA"

Campo da Invenção

[001] A presente invenção se refere a composições compreendendo polialquileno glicol e um complexo de hidroxipirona de cobre e seus usos como agentes antimicrobianos. A presente invenção se refere ainda a usos médicos das composições, em particular para a cicatrização de feridas e/ou o tratamento ou prevenção de infecção microbiana.

Antecedentes da Invenção

[002] O desenvolvimento de novos antimicrobianos diminuiu progressivamente desde a década de 1980, deixando um cenário sombrio diante de patógenos emergentes resistentes a múltiplos medicamentos. As chamadas "superbactérias" são cada vez mais reconhecidas como uma ameaça global à saúde pública, impulsionando a exploração de novos antimicrobianos - incluindo agentes inorgânicos, tais como os baseados em cobre e prata. Estes metais tiveram uso histórico e, significativamente, são hipotetizados para agir através de uma multiplicidade de mecanismos biocidas - o que poderia potencialmente aumentar a longevidade clínica, exigindo microrganismos para sofrer múltiplas mutações para ganhar resistência. Dos dois metais, a prata mostrou maior

eficácia antimicrobiana: no entanto, o custo, a toxicidade *in vivo* para o hospedeiro e a instabilidade química tendem a limitar sua utilidade para aplicações clínicas, tais como a cicatrização de feridas infectadas. O cobre, embora geralmente visto como menos eficaz, é barato e, sendo um micronutriente essencial, é mais bem tolerado por humanos e outros animais, permitindo que doses maiores sejam usadas. No entanto, devido à sua menor eficácia biocida, o desenvolvimento de sistemas de liberação que maximizam a biodisponibilidade do cobre a micróbios é crítico para seu uso em ambientes clínicos.

[003] O documento WO 2016/170152 (Medical Research Council) divulga composições de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre nas quais um ou mais ligantes são substituídos de forma não estequiométrica pelos grupos oxo ou hidroxil do oxo-hidróxido de cobre. Composições compreendendo as nanopartículas são divulgadas para uso como composições antibacterianas capazes de liberar cobre livre.

[004] WO 98/16218 e Patente US No: 6,197,763 (Pflori limited) descrevem o uso de complexos terapêuticos formados entre metais dietéticos, tais como cobre, manganésio ou ferro, e ligantes incluindo ascorbato, aspartato, citrato, histidina, malato, maltol (3-hidroxil-2-metil-4-pirona), gluconato, glutamato, glutamina, succinato e tartarato para uso no tratamento de infecções bacterianas

gastrointestinais. O documento WO 00/16736 se refere a complexos de alfa-hidroxiketona cíclica de cobre como ingredientes ativos em cuidados orais com atividade anti-placa. JP 2002/255956 descreve complexos de pirona de cobre como agentes antifúngicos em produtos alimentares. Hudekova et al. (Foli Microbiol., 41 (6): 473-476, 1996) descreve complexos de ácido kójico de íons metálicos preparados com Cu, Zn, Mn, Mg ou Ni, que foram testados quanto à atividade antibacteriana e antifúngica. Verificou-se que os complexos de cobre eram apenas ativos contra *B. subtilis* e *P. aeruginosa*.

[005] O desenvolvimento de abordagens para a distribuição eficaz de íons metálicos antimicrobianos, tal como o cobre, continua a ser um problema não resolvido na técnica, especialmente para uso em um contexto clínico.

Sumario da Invenção

[006] De um modo geral, a presente invenção é baseada nos resultados de que composições antibacterianas compreendendo um complexo de hidroxipirona de cobre são capazes de fornecer cobre em uma forma disponível bactericidamente. Enquanto agentes complexantes fortes mantêm o cobre em solução, incluindo fluidos fisiológicos, e assim espera-se que sejam bons veículos de entrega para o cobre biocida, os presentes inventores descobriram que em complexos como cobre EDTA, ligantes com afinidade excessiva

para o cobre têm o efeito de fazer uma proporção do metal de cobre não disponível para interação com bactérias, suprimindo significativamente sua ação antibacteriana. Por outro lado, os sais de cobre, tal como o cloreto de cobre, são capazes de fornecer cobre livre às bactérias e são, portanto, vantajosos em relação aos complexos de cobre fortes.

[007] No entanto, estas composições sofrem da desvantagem de o seu efeito bactericida ser diminuído na presença de componentes de relevância biológica, tais como proteínas. Essa limitação é clinicamente relevante, uma vez que a proteína é um componente abundante nos fluidos fisiológicos, como o exsudado da ferida. Por conseguinte, a presente invenção fornece agentes antibacterianos à base de cobre que melhoram estas duas desvantagens através do uso de complexos de cobre anfifílicos, por exemplo aqueles formados entre o cobre e as hidroxipironas, tais como o maltol. Isto foi demonstrado por experimentos em que o cobre foi incubado em meio bacteriano compreendendo BSA que mostrou que o maltol de cobre suprimiu completamente o crescimento de *E. coli* a 40 ppm de cobre, enquanto o cloreto de cobre apenas atingiu 60% de inibição a 50 ppm de cobre.

[008] Em outros aspectos, a presente invenção se refere a pomadas à base de PEG mostrando que elas são particularmente eficazes para administração tópica de

complexos anfifílicos de cobre. Em particular, as pomadas de PEG mostraram limitar o crescimento bacteriano, mesmo quando na ausência de agente de cobre. No entanto, este efeito bacteriostático é aqui mostrado como um verdadeiro efeito biocida quando as hidroxipironas de cobre são adicionadas ao PEG.

[009] Surpreendentemente, foi ainda notado que as pomadas de PEG contendo maltol de cobre se tornaram mais eficazes à medida que envelheceram mais do que 3 semanas após a preparação pareceram mais eficazes do que após alguns dias de preparação no modelo porcino de forma que as unidades formadoras de colônias de MRSA por gramas de biópsia de pele foram 1,6 log CFU/g versus 5,1 log CFU/g, respectivamente. Embora não desejem estar limitados por qualquer teoria particular, os presentes inventores acreditam que a associação entre os dois componentes se torna mais vantajosa para a atividade antimicrobiana tópica ao longo do tempo.

[0010] Surpreendentemente, as composições antibacterianas da presente invenção tinham eficácia antibacteriana equivalente a das pomadas de PEG contendo o antibiótico, mupirocina. Enquanto o cobre é conhecido por ser um agente antimicrobiano, é geralmente um inferior em comparação com antibióticos padrão. É, portanto, surpreendente que os complexos de hidroxipirona de cobre da presente invenção forneçam o resultado de soro como com a

mupirocina nestes experimentos. Os presentes inventores acreditam que esta é uma consequência da combinação de complexos de hidroxipirona de cobre e polialquileno glicol.

[0011] Uma outra vantagem da associação entre o maltol de cobre e o PEG, aqui referidos como conjuntos de maltol-PEG de cobre, é que protege os complexos de cobre da degradação. Por exemplo, o cobre cuprico (Cu^{2+}) complexado com maltol converte-se gradualmente na forma cuprosa (Cu^+) quando em solução alcalina, como evidenciado pela formação de um precipitado vermelho. Presume-se que este efeito seja mediado pelo maltol, o que provavelmente promove a redução do cobre. Surpreendentemente, a adição de polialquileno glicóis tais como o PEG suprime este fenômeno. Sem querer estar vinculado a qualquer teoria em particular, a formação de conjuntos de PEG maltol de cobre parece proteger o maltol de cobre da degradação, em particular a degradação redox que faz com que o Cu^{2+} seja reduzido a Cu^+ , como indicado por uma mudança de cor nos complexos de cobre nas composições de verde (Cu^{2+}) a vermelho (Cu^+).

[0012] Ligantes anfifílicos são usados para acentuar o poder bactericida do cobre. Sem querer estar vinculado por qualquer teoria particular, os inventores esperam que a capacidade dos ligantes anfifílicos para atravessar as barreiras de membrana seja vantajosa bactericamente na medida em que é provável que promova a internalização do

cobre em células bacterianas.

[0013] As pomadas de PEG compreendendo complexos anfifílicos, tais como o maltol, podem adicionalmente compreender silicatos solúveis ou silicatos de particulados coloidais ou maiores. Evidências sugerem que o silicato promove a cicatrização de feridas. Usualmente, as presentes composições são receptivas à inclusão de silicatos tais como pequenos colóides de silicato amorfo e, mais importante, estes silicatos não interagem com o cobre como seria normalmente esperado, desde que o cobre esteja em um complexo, tal como com o maltol.

[0014] Em um aspecto, a presente invenção fornece uma composição antibacteriana compreendendo um complexo de polialquileno glicol e hidroxipirona de cobre. De preferência, o complexo de hidroxipirona de cobre compreende maltol e/ou etilmaltol. Mais preferencialmente, a composição antibacteriana compreende maltol de cobre.

[0015] Os polialquileno glicóis são uma família de compostos de poliéter que incluem polietileno glicol (PEG) e polipropileno glicol. Em algumas modalidades, é possível empregar combinações de mais de um polialquileno glicóis diferentes, por exemplo, dois, três, quatro ou cinco ou mais açúcares ou polialquileno glicóis. Nas composições antibacterianas da presente invenção, preferivelmente o polialquileno glicol é polietileno glicol (PEG) ou

polipropileno glicol. As composições formadas entre o polialquilenoglicol e o complexo de hidroxipirona de cobre serão geralmente uma pomada ou creme e, portanto, adequados para aplicação externa (por exemplo, aplicação tópica) a um indivíduo que necessite de tratamento. De preferência, a proporção de cobre para maltol é entre 1:0,5 e 1:10, ou 1:1 e 1:5, ou 1:1 e 1:4.

[0016] De preferência, as composições compreendem pelo menos 10% (p/p) do polialquilenoglicol, mais preferivelmente pelo menos 20% (p/p) do polialquilenoglicol, pelo menos 30% (p/p) do polialquilenoglicol, pelo menos 40% (p/p) do polialquilenoglicol, pelo menos 50% (p/p) do polialquilenoglicol e, opcionalmente, pelo menos 60% (p/p) do polialquilenoglicol.

[0017] Em algumas modalidades, a composição antibacteriana compreende ainda uma forma de silicato biodisponível, seja silicatos solúveis, particulados ou coloidais.

[0018] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece uma composição antibacteriana, tal como aqui descrito, para uso em um método de tratamento de uma infecção microbiana, por exemplo, para o tratamento de uma infecção bacteriana, tal como uma infecção por MRSA. Em outros usos, as composições da presente invenção podem ser empregues profilaticamente, por exemplo, no tratamento de feridas.

[0019] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo a composição antibacteriana como aqui descrita.

[0020] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma composição antibacteriana da presente invenção para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de infecção microbiana.

[0021] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de uma infecção microbiana, compreendendo o método administrar a um paciente com necessidade de tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição antibacteriana da presente invenção.

[0022] Modalidades da presente invenção serão agora descritas a título de exemplo e não limitação com referência às figuras anexas. Contudo, vários outros aspectos e modalidades da presente invenção serão evidentes para os especialistas na técnica tendo em vista a presente divulgação.

[0023] "e/ou" quando aqui utilizado, deve ser tomado como uma divulgação específica de cada uma das duas características ou componentes especificados, com ou sem o outro. Por exemplo, "A e/ou B" deve ser tomado como divulgação específica de cada um de (i) A, (ii) B e (iii) A e B, como se cada um fosse aqui descrito individualmente.

[0024] A menos que o contexto determine de outro modo, as descrições e definições das características definidas acima não estão limitadas a qualquer aspecto particular ou modalidade da invenção e aplicam-se igualmente a todos os aspectos e modalidades que são descritas.

Breve Descrição das Figuras

[0025] **Figura 1.** Inibição do crescimento de *E. coli* em HMM (pH 7,2) após 6 horas de incubação com complexos CuCl_2 , Cu:EDTA com proporção 1:1 e 1:10 e EDTA apenas com concentrações equivalentes àsquelas presentes no complexo Cu:EDTA 1:10.

[0026] **Figura 2.** Inibição do crescimento de *E. coli* após incubação com CuCl_2 e CuMaltol (proporção 1:1) em HMM com 4% de BSA durante 6 horas.

[0027] **Figura 3.** Crescimento de *E. coli* ao longo do tempo - medido como absorbância a OD de 595nm - na presença de pomadas de PEG sem cobre adicionadas como 10 e 20% do volume de cultura bacteriana, ou seja, 0,05ml ou 0,1ml de PEG em 0,5 ml de cultura bacteriana.

[0028] **Figura 4.** Crescimento de *E. coli* ao longo do tempo - medido como absorbância a OD 595nm - em HMM após incubação com pomadas a 10% (ver métodos).

[0029] **Figura 5.** Liberação de cobre em NaHCO_3 50 mM a pH 7,0 de pomadas de PEG contendo CuEOTA, Cu Maltol (ambos com proporções de 1: 4 Cu: agente complexante) e CuCl_2 (todos

1000 ppm de Cu).

[0030] **Figura 6.** Contagens bacterianas no modelo de ferida por MRSA tratadas com pomadas de PEG compreendendo maltol de cobre (1: 4 Cu: maltol) ou Mupirocina (N = 3 porcos). Mais detalhes são fornecidos na seção de métodos. Pomada de PEG. CuMaltol (proporção 1: 4) pomada continha 30 mM de silicato (uSANS) e 1000 ppm de Cu.

[0031] **Figura 7.** Contagens bacterianas no modelo de ferida por MRSA tratadas com pomadas de PEG compreendendo maltol de cobre (1:4 Cu: maltol) ou Mupirocina. Mais detalhes são fornecidos na seção de métodos.

[0032] **Figura 8:** Liberação de cobre das pomadas de CuMaltol PEG (1000 ppm Cu) com ou sem silicatos em NaHCO₃ 50 mM a pH 7,0.

[0033] **Figura 9:** Inibição do crescimento de *E. coli* após exposição de complexos de Cu com etilmaltol (proporção 1:1) em HMM com BSA a 4% durante 6 horas.

[0034] **Figura 10:** Inibição do crescimento de *E. coli* após exposição de complexos de Cu com maltol e etilmaltol (proporção 1:4) em HMM com 4% de BSA durante 6 horas.

Descrição detalhada

Formulações e Usos

[0035] As composições antibacterianas da presente invenção podem ser formuladas para o uso como agentes antibacterianos ou agentes antimicrobianos, por exemplo para

o tratamento ou prevenção de infecções bacterianas ou microbianas. Consequentemente, as composições da presente invenção podem compreender, para além de um ou mais dos materiais em fase sólida da invenção, um excipiente, carreador, tampão, estabilizante farmacêuticamente aceitável ou outros materiais bem conhecidos dos peritos na técnica. Tais materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir significativamente com a eficácia dos materiais de fase sólida para a aplicação em questão.

[0036] O termo "antibacteriano" tal como aqui utilizado inclui o tratamento ou prevenção de infecções causadas por microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos incluindo *Escherichia* sp., tais como *E. coli*, *Staphylococcus* sp., tais como *S. epidermis*, *S. aureus* e *staphylococcus aureus* resistente à meticilina ("MRSA"), *Bacillus* sp., tais como *B. subtilis*, *Pseudomonas* sp., tais como *P. aeruginosa*, *Vibrio* sp., tais como *V. fisheri*, *Streptococcus* sp., tais como *S. pyrogenes* e *S pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp., tais como *M. luteus*, *Clostridium* sp. tais como *C. difficile*, *Acinetobacter* sp. tais como *A. baumannii*, *Mycobacterium* sp., tais como *M. tuberculosis* e *Salmonella* sp, ou fungos incluindo *Candida* sp., tal como *C. albicans*. O termo "antimicrobiano", tal como aqui utilizado, é entendido como aplicável a substâncias incluindo as que inibem a ligação microbiana a superfícies, matam micróbios

e/ou inibem a reprodução microbiana. Entende-se que o termo "micróbio" inclui todos os microrganismos, incluindo as bactérias descritas acima, bem como fungos tais como levedura, archaea e protistas. Os termos "microbiano" e "antimicrobiano" devem ser interpretados de acordo.

[0037] O uso das composições antibacterianas da presente invenção dependerá muito do facto de as composições se destinarem ao tratamento ou prevenção de infecção em um indivíduo humano ou animal, ou para fornecer uma superfície de um artigo que seja resistente à colonização bacteriana ou microbiana. Exemplo da última aplicação inclui o fornecimento de revestimentos para equipamento médico ou curativos.

[0038] No entanto, além de ter aplicações para o tratamento ou prevenção de condições em indivíduos humanos, a presente invenção tem aplicação no campo veterinário, por exemplo, para uso no tratamento de um animal não humano, e mais especialmente mamíferos não humanos tais como cães, gatos e cavalos.

[0039] Em modalidade em que as composições se destinam à administração ao indivíduo, por exemplo no tratamento de feridas ou de infecções da pele, a natureza precisa do carreador ou outro componente pode estar relacionado com o modo ou via de administração da composição, tipicamente através uma rota tópica. Isto pode incluir a

formulação das composições antibacterianas em uma matriz sólida, semissólida ou em gel ou em um carreador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Exemplos de carreadores incluem solução salina fisiológica, dextrose ou solução de outro sacarídeo ou glicóis tais como etilenoglicol, propileno glicol ou polietileno glicol podem ser incluídos.

[0040] Os materiais e composições utilizados de acordo com a presente invenção que devem ser administrados a um indivíduo são preferivelmente administrados em uma "quantidade profilaticamente eficaz" ou em uma "quantidade terapêuticamente eficaz" (conforme o caso, embora a profilaxia possa ser considerada terapia), sendo isto suficiente para mostrar benefício ao estado clínico individual. A quantidade real administrada e a taxa e o tempo de administração dependerão da natureza e gravidade do que está sendo tratado. A prescrição de tratamento, por exemplo, decisões sobre dosagem etc., é de responsabilidade de clínicos gerais e outros médicos, e normalmente leva em conta o distúrbio a ser tratado, a condição do paciente individual, o local de entrega, o método de administração e outros fatores conhecidos praticantes.

[0041] Exemplos das técnicas e protocolos mencionados acima podem ser encontrados em Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edição, 2000, Lippincott,

Williams & Wilkins. Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, simultaneamente ou sequencialmente, dependendo da condição a ser tratada.

[0042] Em outras modalidades, as composições antibacterianas da presente invenção podem ser formuladas para administração tópica, por exemplo, na forma de uma pomada sólida ou semissólida útil no tratamento de feridas, úlceras ou no tratamento ou prevenção de infecção bacteriana. Em tais aplicações, os polialquilenos glicóis são bem adequados para a administração externa, e especialmente tópica, dos materiais à medida que formam creme ou pomada e estão disponíveis em uma faixa de diferentes pesos moleculares, permitindo a adaptação da viscosidade e outros parâmetros físicos que podem ser desejáveis na pomada final. Em algumas modalidades, o creme ou pomada compreenderá, de preferência, um PEG de baixo peso molecular e um PEG de elevado peso molecular e, opcionalmente, polipropileno glicol. A título de exemplo, o PEG de baixo peso molecular pode ser um polietileno glicol com um peso molar entre 200 g/mol e 600 g/mol, e mais preferencialmente um polietileno glicol com um peso molecular entre 380 g/mol e 420 g/mol, por exemplo, um PEG 400. De preferência, o PEG de elevado peso molecular é um polietileno glicol com um peso molecular entre 1500 g/mol e 4000 g/mol, e mais preferencialmente é um

polietileno glicol com um peso molecular entre 3200 g/mol e 3500 g/mol, por exemplo, um PEG 3350. Em alguns casos, o polialquilenoglicol utilizado nas formulações da presente invenção compreende uma combinação de um ou mais polietileno glicóis e um ou mais polipropileno glicóis, tais como uma combinação de PEG 400, PEG 3350 e polipropileno glicol. A aplicação da presente invenção a produtos tópicos tem uso terapêutico para cicatrização de feridas e como em composições anti-infecciosas. Em algumas modalidades da presente invenção, a administração tópica não inclui a administração oral.

[0043] Em todos os aspectos da presente invenção, nos quais as composições são formuladas para administração a um indivíduo, é preferido que o pH da composição ou uma formulação que a contém seja elevado a um pH fisiológico, preferivelmente a um pH entre 5,0 e 9,0 e mais preferencialmente a um pH entre 6,0 e 8,5. Os exemplos mostram que as composições da presente invenção são capazes de tornar o cobre livre biodisponível sob estas condições. Convenientemente, isto pode ser feito adicionando uma base, tal como hidróxido de sódio ou carbonato de sódio, ou um ácido tal como ácido clorídrico. O objetivo disto é que a administração a um indivíduo não resulte em desfechos clínicos não intencionais, como dor ou inflamação.

[0044] Além do complexo de hidroxipirona de cobre,

as composições antibacterianas da presente invenção podem compreender uma composição de silicato, seja na forma de silicatos solúveis, particulados ou coloidais. Uma forma particularmente preferida de composição de silicato são nanosilicatos amorfos ultrafinos ("uSANS") nos quais as partículas de sílica com um diâmetro médio entre 0,5 nm e 20 nm são opcionalmente estabilizadas por um ou mais agentes estabilizantes. As composições compreendendo composições de nanosílica estabilizada que incluem agentes estabilizantes e processos para a sua produção estão descritas em WO 2015/121666 (Medical Research Council) e PCT/EP2017/070183 reivindicando prioridade de GB-A-1701827.6, todas elas incorporadas por referência na sua totalidade. Exemplos de agentes estabilizantes adequados para o uso com a composição de nanosílica da presente invenção incluem polióis, açúcares e/ou sais de amônio quaternário, tais como colina e carnitina. Em particular, o documento WO 2015/121666 fornece processos para produzir uma composição de silicato polimérico estabilizado compreendendo partículas poliméricas de ácido silícico e nanosílica, nas quais a polimerização de silicatos e o crescimento do tamanho de partícula é controlado e as partículas resultantes são tornadas estáveis ao tamanho através da combinação de concentração de silicato, pH e/ou estabilizador. Em algumas modalidades, as composições podem adicionalmente ser dopadas com cátions de

metal uma vez que estes podem induzir o crescimento do tamanho de partícula e podem fornecer as composições com propriedades adicionais úteis.

[0045] As composições de nanosílica da presente invenção compreendem partículas de ácido polissilícico solúvel e de nanossílica tendo diâmetros médios de 20 nm ou menos, e em alguns casos diâmetros médios que são mais preferivelmente menores que 10 nm, mais preferencialmente menores que 5 nm, 4 nm, 3 nm, 2 nm, 1 nm ou 0,5 nm. Em algumas modalidades, as partículas podem variar de cerca de 0,5 nm a cerca de 2 nm, ou de cerca de 0,5 nm a cerca de 3 nm, ou de cerca de 0,5 nm a cerca de 4 nm, ou de cerca de 0,5 nm a cerca de 5 nm, ou de cerca de 0,5 nm a cerca de 10 nm, ou de cerca de 0,5 nm a cerca de 15 nm, ou de cerca de 0,5 nm a cerca de 20 nm, ou de cerca de 5 nm a cerca de 20 nm, ou de cerca de 5 nm a cerca de 15 nm, ou de cerca de 5 nm a cerca de 10 nm, ou de cerca de 10 nm a cerca de 15 nm, ou de cerca de 10 nm a cerca de 20 nm, ou de cerca de 15 nm a cerca de 20 nm. As composições preferidas incluem partículas de sílica com um diâmetro médio entre 0,5 e 10 nm e partículas de sílica com um diâmetro médio entre 2 e 5 nm.

[0046] A natureza não solúvel das partículas poliméricas de ácido silícico e/ou nanosílica pode ser confirmada indiretamente pelo ensaio do ácido molibdico mencionado acima, uma vez que isto determina a fração de

ácido silícico solúvel. Em geral, os materiais estarão em equilíbrio com o ácido silícico solúvel, com concentração de ácido silícico solúvel típica sendo cerca de $< 2 \text{ mM}$ a $\text{pH} < 9,0$. As composições de nanossílica podem ser contrastadas com formas mais condensadas de silicatos, incluindo nanopartículas maiores (por exemplo, tendo um tamanho médio maior que 50nm , e mais preferencialmente maior que 20nm), géis de ácido polissilícico e dióxido de silício (SiO_2) a forma completamente condensada do ácido silícico, em que os grupos $-\text{OH}$ estão virtualmente ausentes. O tamanho das partículas dos ácidos polissilícicos pode ser determinado utilizando dispersão de luz dinâmica e é preferido que as medições sejam feitas em amostras frescamente preparadas, se não estabilizadas. Como será entendido pelos peritos na técnica, os ácidos polissilícicos estarão em equilíbrio com outras espécies de silicatos. Por exemplo, e dependendo das condições precisas presentes, isto pode incluir quantidades menores de ácido silícico solúvel.

[0047] Uma quantidade eficaz de composições antibacterianas aqui descritas pode ser formulada para aplicação tópica, por exemplo, para a pele, unhas ou cabelos. Estas composições podem estar na forma de cremes, loções, géis, suspensões, dispersões, microemulsões, nanodispersões, microesferas, géis de hidrogênio, emulsões (óleo em água e óleo em água, bem como emulsões múltiplas) e géis

multilaminares e semelhantes (ver, por exemplo, The Chemistry and Manufacture of Cosmetics, Schlossman et al., 1998), e podem ser formulados como composições aquosas ou de silicone ou podem ser formulados como emulsões de uma ou mais fases oleosas em uma fase aquosa contínua (ou uma fase aquosa em uma fase oleosa). O tipo de carreador utilizado na presente invenção depende das propriedades da composição tópica. O carreador pode ser sólido, semissólido ou líquido. Os carreadores adequados são líquidos ou semissólidos, tais como cremes, loções, géis, bastões, pomadas, pastas, sprays e mousses. Especificamente, o carreador está na forma de um creme, uma pomada, uma loção ou um gel, mais especificamente um que tem uma espessura ou ponto de escoamento suficiente para evitar que as partículas sedimentem. O carreador pode ser inerte ou possuir benefícios próprios. O carreador também deve ser fisicamente e quimicamente compatível com a composição antibacteriana ou outros ingredientes formulados no carreador. Exemplos de carreadores incluem água, hidroxietilcelulose, propileno glicol, butilenoglicol e polietilenoglicol, ou uma combinação dos mesmos.

[0048] Além do uso terapêutico das composições antibacterianas da presente invenção, elas também podem ser aplicadas como revestimentos antimicrobianos ou antibacterianos em artigos, por exemplo, revestimentos em substratos que compreendem tecido, não tecido, plástico,

vidro e/ou metal. A natureza antimicrobiana dos revestimentos torna-os particularmente adequados para serem aplicados a substratos para uso em aplicações médicas ou de cuidados pessoais. Em particular, os revestimentos são particularmente úteis em substratos que estão em contato com o corpo, por exemplo com pele ou membrana mucosa, em utilização normal, por exemplo, curativos, ataduras e emplastos.

[0049] Por exemplo, o crescimento microbiano é um problema particular quando a pele ou a membrana mucosa é coberta, por exemplo por um curativo, fralda ou roupa íntima. Logo que a pele ou a membrana da mucosa ficam cobertas, as condições ambientais do crescimento microbiano melhoram. Os micróbios presentes na pele coberta ou na membrana da mucosa podem multiplicar-se a taxas aumentadas, particularmente quando o ambiente está úmido e/ou não exposto ao ar. As secreções destes micróbios incluem excreções ácidas ou alcalinas que podem alterar o pH da pele, a secreção de toxinas e a secreção enzimática, incluindo a secreção de protease. Essas secreções e excreções podem causar irritação da pele e das membranas mucosas e, nos casos mais graves, a quebra da pele ou das membranas mucosas, tal como a dermatite.

[0050] Condições particulares que podem ocorrer após a cobertura da pele ou da membrana da mucosa incluem aftas.

A afta é uma infecção fúngica pelo gênero *Candida* da levedura, particularmente a *Candida albicans*. Os sintomas incluem coceira, ardor e dor e inflamação da área infectada. O uso de curativos higiênicos, absorventes para incontinência, fraldas e/ou roupas íntimas apertadas podem produzir condições favoráveis ao crescimento da *Candida*, o que pode levar a aftas. Os revestimentos da presente invenção podem ser eficazes contra fungos tais como leveduras e, conseqüentemente, será entendido que fornecer os revestimentos da invenção nos itens acima mencionados pode permitir o tratamento e/ou profilaxia de aftas.

[0051] Da mesma forma, a dermatite de contato (comumente conhecida como assaduras) pode ser causada pelo uso de absorventes ou fraldas para incontinência. A pele úmida ou molhada perde a sua estrutura, o pH elevado pode promover o crescimento bacteriano e as bactérias podem secretar enzimas que racham o tecido da pele. Este ambiente também pode promover ou agravar as úlceras de pressão (comumente conhecidas como assaduras), que são particularmente problemáticas quando se infectam. Verificou-se que os revestimentos da presente invenção são eficazes contra bactérias e, conseqüentemente, será entendido que o fornecimento dos revestimentos da invenção em tampões, curativos higiênicos, curativos para incontinência ou fraldas pode permitir o tratamento e/ou profilaxia da

dermatite de contato e/ou úlceras de pressão.

[0052] Por razões semelhantes, a dermatite de contato e as infecções fúngicas podem ocorrer sob curativos médicos, por exemplo, curativos para feridas e queimaduras. Uma consideração adicional com curativos médicos é a necessidade de prevenir a infecção bacteriana da ferida ou queimadura. Quando a pele é queimada, uma grande quantidade de tecido pode ser danificada, o que pode reduzir ou destruir as propriedades de barreira natural da pele, e feridas que racham a pele também afetam as propriedades de barreira da pele. Isso pode levar a uma infecção oportunista que pode retardar a cicatrização e o choque séptico. Além disso, a infecção microbiana, particularmente a infecção bacteriana, pode ser um problema após a cirurgia. O uso de dispositivos médicos ou cirúrgicos, por exemplo dispositivos médicos implantáveis, que são revestidos com os presentes revestimentos antimicrobianos, podem ajudar a prevenir a infecção pós-cirúrgica. Consequentemente, será entendido que fornecer os revestimentos da invenção em curativos para feridas e/ou queimaduras pode permitir o tratamento e/ou profilaxia da dermatite de contato e/ou infecção microbiana.

[0053] As composições antibacterianas da presente invenção podem então ser utilizadas na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecções microbianas e/ou de desordens da pele ou das membranas de

mucosas tais como inflamação e dermatite. Em particular, os revestimentos antibacterianos ou antimicrobianos podem ser úteis para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de uma ferida, infecção de uma queimadura, infecção de úlcera por pressão, infecção pós-cirúrgica, aftas, dermatite de contato e úlceras por pressão. A infecção microbiana pode ser por qualquer microorganismo, em particular, bactérias e/ou leveduras, tais como *Staphylococcus sp.*, tais como *S. aureus*, *Pseudomonas sp.*, tais como *P. aeruginosa*, *Micrococcus sp.*, tais como *M. luteus*, *Saccharomyces sp.*, tais como *S. cerevisiae*, *Candida sp.*, tais como *C. albicans*, *Staphylococcus sp.*, tais como *S. epidermis*, *Streptococcus sp.*, tais como *S. pyogenes*, *Klebsiella sp.* e *Escherichia sp.*, tais como *E. coli*, *Chlamydia sp.* As composições podem ainda ser ativas contra vírus ou parasitas. O medicamento pode ser um substrato revestido pelos métodos de revestimento da presente invenção. Por exemplo, então, o medicamento pode ser um substrato revestido, tal como um dispositivo médico revestido, por exemplo, um dispositivo médico implantável. Os exemplos incluem uma semente cirúrgica, cateter (como um cateter urinário, um cateter de acesso vascular, um cateter peridural), uma porta de acesso vascular, um sensor intravascular, um tubo de traqueotomia, um tubo de gastrostomia endoscópica percutânea, um tubo endotraqueal, um dispositivo de prótese implantável, tal como um stent e

dispositivos de curta habitação relacionada ou de biocontato. O medicamento pode ser um substrato revestido, tal como uma fralda revestida, toalhas higiênicas, tampões, almofada de incontinência, curativos, tal como um de feridas ou queimaduras, ataduras ou roupa íntima. Muitos destes substratos (particularmente fraldas, toalhas higiênicas, almofadas de incontinência e curativos, tais como curativos para feridas ou queimaduras) compreendem um componente de tecido não tecido, que pode estar em contato com a pele ou com a membrana da mucosa em utilização normal. Os presentes inventores demonstraram que os revestimentos e métodos de revestimento da presente invenção são particularmente adequados para substratos de tecido não-tecido.

[0054] Como aqui utilizado, o termo "tecido não tecido" inclui tecidos ou têxteis forrados a partir de uma teia de fibras. Em tecido não tecido, as fibras não são tecidas ou tricotadas. Os não-tecidos são tipicamente fabricados colocando pequenas fibras juntas na forma de uma folha ou teia, e então ligando-as mecanicamente. Exemplos de tecidos não tecidos incluem não tecidos de polipropileno.

[0055] Será entendido que o processo de fabricação do medicamento inclui o fornecimento de um revestimento antimicrobiano em um substrato. Por conseguinte, a fabricação do medicamento pode compreender qualquer uma das etapas dos métodos aqui descritos para fornecer

revestimentos antimicrobianos.

[0056] A presente invenção também fornece substratos revestidos pelos presentes métodos. Os substratos revestidos podem ser utilizados em um método de tratamento médico e incluem os substratos revestidos acima mencionados como medicamentos possíveis. Será entendido que a presente invenção também fornece um método de tratamento médico para o tratamento e/ou profilaxia de infecções microbianas e/ou de desordens da pele ou membrana da mucosa, e o uso dos presentes substratos revestidos em tais métodos. Os métodos de revestimento da presente invenção são aplicáveis ao revestimento dos substratos aqui mencionados, como medicamentos ou outros.

[0057] Além das aplicações descritas acima, os revestimentos antimicrobianos também podem ser fornecidos em outros equipamentos para uso em aplicações médicas, por exemplo, em hospitais. Existe um interesse significativo em controlar infecções em hospitais, em particular infecções bacterianas, como MRSA e *Clostridium difficile*. Como discutido acima, a colonização microbiana de superfícies é um problema particular. No entanto, verificou-se que os presentes revestimentos são eficazes contra muitas espécies de micróbios e, portanto, será entendido que fornecer os revestimentos antimicrobianos presentes na superfície do equipamento hospitalar pode ser benéfico. Consequentemente,

os substratos que podem ser revestidos de acordo com a presente invenção incluem equipamento médico e dispositivos que contatam o corpo ou fluidos corporais em utilização normal. Por exemplo, substratos adequados incluem tubos, bolsas de fluido, cateteres, seringas e equipamentos cirúrgicos, tais como bisturis e fórceps etc. Adicionalmente, outros equipamentos, por exemplo, equipamentos usados em hospitais (por exemplo, equipamentos de saúde) podem ser revestidos de acordo com a presente invenção, por exemplo, batas (por exemplo, batas cirúrgicas), máscaras cirúrgicas, luvas de proteção (por exemplo, luvas cirúrgicas e de exame), cortinas, uniformes e roupas de cama, tais como fronhas, colchões impermeáveis (por exemplo, berços e camas de terapia intensiva) e lençóis.

[0058] Equipamentos de saúde alternativos incluem cortinas cirúrgicas, meias cirúrgicas, móveis, tal como mesas, incluindo mesas de cabeceira, camas e superfícies de assento, e outros equipamentos, incluindo recipientes de armazenamento, filtros e bandejas de serviço.

[0059] Adicionalmente, os revestimentos da invenção são úteis em equipamento de revestimento que é desejável manter livre de micróbios, por exemplo equipamento que é utilizado no processamento de alimentos, por exemplo equipamento e superfícies de cozinha, e equipamento de fábrica usado na fabricação ou no processamento de alimentos.

Por exemplo, os substratos que podem ser revestidos de acordo com a presente invenção incluem recipientes (tais como recipientes de armazenamento de alimentos), transportadores, lâminas, misturadores, rolos e utensílios de cozinha (tais como utensílios de cortar e servir). Substratos adicionais incluem superfícies de preparação de alimentos, embalagens flexíveis e rígidas e maçanetas.

[0060] Além disso, roupas protetoras usadas pelos trabalhadores, como macacões, luvas, máscaras e chapéus podem ser revestidos. Outras roupas que podem ser revestidas incluem roupas íntimas, meias, roupas esportivas, roupas cirúrgicas, roupas de saúde, sapatos e botas.

[0061] Outros substratos adequados para revestimento incluem filtros, por exemplo, filtros médicos (incluindo meios de filtração de respiradores e meios de filtração de fluido), e outros filtros incluindo meios de filtração HVAC, meios de filtração de água e meios de filtração de fluidos.

[0062] Outros substratos adequados incluem moeda, cartões de débito/crédito, resíduos industriais e equipamentos de movimentação de água, produção de petroquímicos e petróleo bruto, equipamentos e infraestrutura de distribuição e armazenamento. Substratos adequados adicionais incluem equipamento de proteção pessoal e aparato militar, tais como máscaras, respiradores, roupas de descontaminação e luvas.

Experimental

Exemplificação da proteção Redox

Estoques

[0063] Um estoque de cobre de 40 mM foi preparado dissolvendo 0,347 g de di-hidrato de cloreto de cobre em 50 mL de água. A solução resultante foi azul.

[0064] Um estoque de maltol de 160 mM foi preparado dissolvendo 1,01 g de maltol em 50 mL de água e ajustado o pH com NaOH (pH > 10,5. Isso produziu uma solução límpida.

Experimento A: degradação do maltol de cobre

[0065] Os estoques de cobre e maltol foram misturados em água em proporções de 1:1 (v:v) produzindo uma solução verde. O pH foi então ajustado para 11,8 com hidróxido de sódio para acelerar a conversão redox. Durante a noite, um precipitado vermelho (hidróxido cuproso) foi depositado no fundo do frasco.

Experimento B: Conjuntos de maltol-PEG de cobre previnem a conversão redox

[0066] Igual ao experimento A, mas foi adicionado PEG a 30% (p/p). Nenhuma conversão ao hidróxido cuproso foi observada mesmo após vários dias.

Materiais e métodos

Preparação de pomadas de PEG

Preparação geral de pomadas de PEG

[0067] As pomadas de PEG são geralmente compostas

por 1) uma fase à base de PEG compreendendo polietileno glicol (PEG) e propileno glicol (PPG) e 2) uma fase aquosa compreendendo materiais de cobre e silicato. Para preparar 30 g de uma pomada à base de PEG, 11,4 g de polietileno glicol 3350 (PEG 3350), 9,75 g de PEG 400 e 3,81 g de propileno glicol (PPG) foram pesados em tubos de falcão separados e aquecidos até 65 °C até o PEG3350 ser totalmente derretido. O PEG 400 e o PPG foram primeiramente misturados em um becker de 100 ml e o PEG 3350 fundido foi então adicionado e misturado utilizando um agitador suspenso. Prepararam-se materiais de cobre de acordo com a Tabela 1 e depois adicionaram-se 5 ml de uma fase aquosa à mistura de PEG (conforme tabela abaixo). Finalmente, o pH foi ajustado para 7-8 usando soluções de HCl 6 M ou NaOH 5 M (medido com tiras de pH). As pomadas finais são misturadas durante pelo menos 5 minutos e transferidas para recipientes apropriados para solidificar durante a noite.

Tabela 1: Preparação de estoques para pomadas de PEG

Estoque	Protocolo
----------------	------------------

<p>(1)</p> <p>CuMaltol, proporção 1:1</p> <p>Cu 0,4M, Maltol 0,4M</p>	<p>Preparou-se uma solução de maltol 2M dissolvendo 3,5 g de NaOH em 25 ml de água UHP, seguindo-se a adição de 12,6 g de maltol enquanto a solução ainda estava quente da dissolução de NaOH. Uma vez que o maltol foi completamente dissolvido, o volume foi ajustado para 50 ml com água UHP.</p> <p>O complexo CuMaltol (proporção 1: 1) foi preparado diluindo esta solução de maltol 2M em 12 ml de água alcalina (11 ml de água + 1 ml de NaOH 5M) e depois misturando - sob agitação vigorosa - com 4 ml de CuCl₂ 2M.</p>
<p>(2) CuCl₂ 2M</p>	<p>17,05 g de CuCl₂.2H₂O foram dissolvidos em água UHP até um volume final de 50 ml.</p>
<p>(3) CuEDTA, proporção 1:4</p> <p>Cu 0,2 M, EDTA 0,8 M</p>	<p>Preparou-se uma solução alcalina de EDTA (1 M) dissolvendo 4,4 g de NaOH e 11,7 g de EDTA em um volume total de 40 ml. O complexo CuEDTA foi preparado misturando 16 ml de solução alcalina de EDTA com 2 ml de NaOH 5 M e 2ml de CuCl₂ 2M.</p>
<p>(4)</p> <p>CuMaltol, proporção 1:4</p> <p>Cu 0,4 M, Maltol 1,6 M</p>	<p>Uma solução de maltol 2M foi preparada como descrito em (1). Adicionou-se 4 ml de CuCl₂ 2 M a 16 ml de solução de Maltol sob agitação vigorosa. Uma pasta espessa foi formada e a mistura manual foi necessária para homogeneizar completamente o complexo.</p>

(5) uSANS 500 mM	4 ml de silicato de sódio (6,25 M Si) foram diluídos em 44 ml de água. Então o pH foi rapidamente diminuído com 2 ml de HCl 37% para pH <1.
---------------------	---

Tabela 2: Composição da fase aquosa de pomadas de PEG contendo ca. 1000ppm Cu

Material	Componentes da fase aquosa
apenas PEG (sem cobre)	5 g de água UHP
PEG + CuMaltol (proporção 1:1)	3,8 g de água UHP 1,2 ml de CuMaltol (Estoque 1)
PEG + CuCl ₂	4,8g de água UHP 0,21ml de CuCl ₂ .2H ₂ O 2M (Estoque 2)
PEG + CuEDTA (proporção 1:4)	2,9 g de água UHP 2,12 ml de CuEDTA 0,2 M (Estoque 3)
PEG + CuMaltol (proporção 1:4)	3,8 g de água UHP 1,2 g de CuMaltol (Estoque 4)
PEG + CuMaltol (proporção 1:4) Silicate (4-SmM)	3,56 g de água UHP 0,25 ml de uSANS 500 mM (Estoque 5)

	1,2g de CuMaltol (Estoque 4)
PEG + CuMaltol (proporção 1:4) + Silicato (30mM)	2,0 g de água UHP 1,8 ml de uSANS 500 mM (Estoque 5) 1,2 g de CuMaltol (Estoque 4)

Preparação de complexos de cobre com EDTA, Maltol e etil maltol para testes antimicrobianos

[0068] Os complexos de Cu-EDTA foram preparados por dissolução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e di-hidrato de etilenodiaminotetracetato de dissódio (EDTA) em água UHP. O pH foi ajustado para $7,5 \pm 0,2$ com NaOH 1M. Várias proporções de Cu: EDTA foram alcançadas mantendo a concentração de cobre a 20 mM (ca. 1270 ppm), enquanto mudando a de EDTA - 20 e 200 mM - alcançando assim proporções de Cu-EDTA de 1:1 e 1:10, respectivamente.

[0069] O Cu Maltol (proporção 1:1) foi preparado misturando volumes equivalentes de solução $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM com uma solução de maltol alcalina (pH > 11) e diluindo rapidamente a mistura para Cu 10 mM (pH final de 5,7).

[0070] O Cu Etilmaltol (proporção 1:1) foi preparado misturando volumes apropriados de solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 80

mM com uma solução alcalina ($\text{pH} > 10,5$) de etilmaltol 20 mM e diluindo rapidamente a mistura para 10 mM de Cu e 10 mM de etilmaltol (pH final de 7,2).

[0071] O CuMaltol (proporção 1:4) foi preparado misturando volumes apropriados de solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 80 mM com uma solução de maltol 60 mM alcalina ($\text{pH} > 10$) e rapidamente diluindo a mistura para Cu 10 mM e maltol 40 mM (pH final de 8,5)

[0072] O Cu Etilmaltol (proporção 1: 4) foi preparado misturando volumes apropriados de 80 mM de solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com uma solução alcalina ($\text{pH} > 10,5$) de etilmaltol e rapidamente diluindo a mistura a 10 mM de Cu e 40 mM de etilmaltol (pH final de 8,5).

Trabalho bacteriano

Meio MOPS de metais pesados (HMM), $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$.

[0073] O HMM é um meio definido desenvolvido para testar metais pesados e aqui foi suplementado com glicose e cas-aminoácidos (hidrolisado ácido de caseína) e, opcionalmente, com 4% de BSA. O HMM foi preparado a partir de soluções de estoque concentradas de cada reagente e o pH foi ajustado para $7,2 \pm 0,2$ (Tabela 1). O meio preparado frescamente foi imediatamente filtrado através de uma membrana de 0,22 micrômetros e armazenado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 3. Composição do meio HMM.

Reagente	Concentração no meio HMM
ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico (MOPS)	40 mM
KCl	50 mM
NH ₄ Cl	10 mM
MgSO ₄	0,5 mM
FeCl ₃ .6H ₂ O	1 µM
Glicerol-2-fosfato	1 mM
Glicose	0,4% (p/v)
Hidrolisado ácido de caseína	0,1% (p/v)

Ensaio antibacteriano in vitro para soluções de cobre líquido

[0074] A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da inibição do crescimento de *E. coli* NCTC110 na presença de compostos de cobre. Um ensaio turbidimétrico foi utilizado para acompanhar a concentração bacteriana ao longo do tempo, pois é proporcional à densidade ótica (OD a 595 nm) em meio líquido. Culturas bacterianas foram cultivadas durante a noite em HMM a 30 °C sob agitação constante (80 rpm). No dia do ensaio, a OD da suspensão bacteriana foi medida a 595 nm em um leitor de placas e diluída em HMM para obter uma OD de 0,05. As soluções de estoque de cobre (consultar a seção "Preparação de complexos de cobre") foram sequencialmente diluídas em HMM (com ou sem BSA a 4%) para atingir concentrações típicas entre 0,8 e 100 mg/L de Cu em um volume de 0,1 ml. Em seguida, 0,1 ml de

cultura bacteriana foi adicionado e incubado com cobre a 30 °C sob agitação constante (80 rpm). As concentrações finais de cobre no ensaio variaram entre 0,4 e 50 ppm e a OD foi medida a cada hora durante um período típico de 6 a 8 horas. O antecedente de OD, isto é, absorbância de OD não causada por bactérias, foi determinado para remover a interferência de leitura do cobre e do caldo. A inibição do crescimento foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Inibição do Crescimento\%} = \frac{(\text{OD Controle} - \text{OD Cobre})}{\text{OD Controle}} \times 100$$

[0075] OD Controle: OD de bactérias incubadas em HMM na ausência de cobre, após a subtração de OD do meio (sem bactérias).

[0076] OD Cobre: OD de bactérias incubadas em HMM na presença de cobre, após a subtração de OD do meio mais uma concentração correspondente de cobre (sem bactérias).

Crescimento in vitro de *E. coli* e efeito bactericida na presença de pomadas de PEG

[0077] As pomadas de PEG foram preparadas no dia anterior ao ensaio (a menos que indicado de outro modo) e 0,05 ml ou 0,1 ml (10% e 20% do volume de cultura bacteriana adicionado, respectivamente) foram transferidos com uma seringa para cavidades na placa de 24 cavidades. 0,5ml de cultura de *E. coli* NCTC11100 em HMM livre de proteína - preparado como descrito no ensaio antimicrobiano para

soluções de cobre - foram adicionados no topo da pomada e incubados por 24 horas a 30 °C com agitação (80rpm). Em 0,6 e 24h, 0,1ml foram coletados e a OD595nm foi medida para acompanhar o crescimento das bactérias. Avaliou-se o efeito bactericida de pomadas de PEG coletando 5 µl das culturas bacterianas expostas ao PEG após 6 horas de incubação e transferidas para placas de ágar. Após incubação durante a noite a 30 °C, as placas de ágar foram investigadas quanto à presença de colônias de *E. coli*.

Determinação da concentração de cobre por ICP-OES

[0078] A espectroscopia de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) foi usada para determinar a concentração elementar de cobre. Todas as amostras foram diluídas em HNO₃ a 5% (v/v) pelo menos 24 horas antes da análise para dissolver completamente os materiais de cobre. Os padrões de calibração foram combinados em matriz em HNO₃ a 5%, variando de 0,1 a 100 ppm. A linha utilizada para detecção de cobre foi de 324,754 nm.

Ensaio de liberação de gel

[0079] 250 mg de cada pomada foram transferidos para um tubo Eppendorf e centrifugados durante 2 min a 5000 rpm. Em seguida, 0,75 ml de uma solução de NaHCO₃ 50 mM (pH 7,0) foram cuidadosamente transferidos para o tubo Eppendorf contendo a pomada. O tubo foi deixado em repouso (sem agitação) à temperatura ambiente e uma alíquota de ca. 500 µl

foram recolhida do topo e analisados por ICP-OES (concentração de cobre).

Testes in vivo de pomadas de PEG contra um patógeno clínico

[0080] Um modelo porcino foi utilizado para investigar a eficácia de pomadas de PEG contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Feridas de espessura parcial profunda (10 mm x 7 mm x 1,0 mm) foram cortadas na área paravertebral e torácica dos porcos com um eletroqueratomo especializado equipado com uma lâmina de 7 mm e as feridas foram separadas uma da outra por 2-3 cm. Imediatamente após o ferimento, 25 µl de suspensão de 10⁵ CFU/mL de MRSA USA300 foram inoculados em cada ferida e dentro de 20 minutos, todas as feridas foram tratadas com ca. 200mg de pomada. Curativos de poliuretano foram usados para cobrir cada ferida após a aplicação de pomadas. Do dia 0 ao dia 4 os tratamentos foram aplicados duas vezes ao dia e após isto (dia 5 ao dia 8) a dose foi reduzida para apenas um tratamento por dia. Nos dias 4 e 8, uma biópsia de pele foi coletada e o número de colônias de MRSA formadas foi determinado para obter uma concentração total de bactérias por massa de biópsia (UFC/g).

Resultados

[0081] As composições de cobre destinadas ao uso clínico antimicrobiano são necessárias para fornecer cobre

em uma forma disponível bactericidamente. Agentes complexantes fortes mantêm cobre em solução, incluindo fluidos fisiológicos, e, portanto, espera-se que sejam bons veículos de entrega para o cobre biocida. No entanto, como ilustrado com EDTA de cobre, os ligantes com afinidade excessiva para o cobre tornam este metal indisponível para interação com bactérias, suprimindo assim significativamente a sua ação antibacteriana (Figura 1). Os sais de cobre, tal como o cloreto de cobre, podem fornecer cobre livre às bactérias e, assim, são vantajosos em relação aos complexos de cobre fortes. No entanto, seu efeito bactericida é grandemente diminuído na presença de componentes de relevância biológica, tal como a proteína. Esta limitação é de relevância clínica, uma vez que a proteína é um componente abundante em fluidos fisiológicos, tal como o exsudado da ferida. A solução óbvia para evitar que o cobre interaja com a proteína seria usar complexos de cobre fortes, mas, como mostrado, eles não são eficazes contra bactérias. Os resultados fornecidos aqui mostram que o uso de complexos anfifílicos, tal como o maltol, supera em muitas dessas questões. Isto foi demonstrado incubando cobre em meio bacteriano compreendendo BSA: maltol de cobre suprimiu completamente o crescimento de *E. coli* a 40 ppm de cobre enquanto o cloreto de cobre apenas conseguiu 60% de inibição a 50 ppm de cobre (Figura 2).

[0082] Em experimentos posteriores, pomadas à base de PEG apropriadas para administração tópica de cobre a partir de complexos anfifílicos de cobre mostraram aumentar o crescimento bacteriano, mesmo quando na ausência de agentes de cobre (Figura 3). No entanto, isto é apenas um efeito bacteriostático - isto é, não bactericida - e de fato a *E. coli* anteriormente exposta a pomadas apenas de PEG mostrou-se permanecer viável, como demonstrado em um ensaio de crescimento em ágar (Tabela 1). Como tal, os inventores descobriram que os agentes de cobre eram necessários para alcançar um verdadeiro efeito biocida. Em primeiro lugar, as pomadas de PEG compreendendo maltol de cobre têm um efeito supressor total sobre o crescimento de *E. coli*, ao contrário das pomadas apenas de PEG, que são apenas parciais (Figura 4). Em segundo lugar, as bactérias expostas a pomadas de PEG compreendendo um complexo anfifílico de cobre deixam de ser viáveis, como demonstrado em um ensaio de crescimento em ágar (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito bactericida de pomadas de PEG contendo em sua composição: Si (5 mM de uSANS); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CuEDTA proporção 1: 4; CuMaltol proporções 1: 1 ou 1: 4, e CuMaltol proporção 1: 4 com 5mM de uSANS (todos contendo 1000 ppm de Cu). Estes resultados são representativos para concentrações de 10 e 20% de pomada na cultura total de *E. coli* após 6 horas de exposição.

Pomada de PEG	somente PEG	+ CuCl ₂	+ CuEDTA 1:4	+ CuMaltol 1:1	+CuMaltol 1:4	+CuMaltol 1:4+ Si
Bactericida (Sim /não)	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim

[0083] Adicionalmente, os presentes inventores observaram que, ao contrário dos complexos fortes, tais como o EDTA de cobre, os complexos de hidroxipirona de cobre exibem uma modesta liberação de cobre das pomadas de PEG (Figura 5). Além disso, um precipitado verde, semelhante a pomada, foi gerado quando soluções de maltol de cobre, que são verdes, foram misturadas com soluções de PEG. É importante ressaltar que a retenção da cor verde implica na ausência de uma interação direta de cobre-PEG, pois isso geraria uma cor azul, como observado nas pomadas de PEG, compreendendo um cloreto de cobre. Sem querer estar vinculado por qualquer teoria particular, os presentes inventores acreditam que os conjuntos de cobre-maltol-PEG são formados em pomadas de PEG. Esta é uma característica particularmente vantajosa na cicatrização de feridas ou no tratamento de infecções tópicas, uma vez que permite a liberação controlada de cobre durante períodos mais longos. De fato, esta eficácia foi demonstrada no tratamento de um modelo de ferida in vivo (Porco) para infecções por MRSA. Surpreendentemente, em alguns casos, as pomadas de PEG contendo maltol de cobre

tinham eficácia antibacteriana equivalente à das pomadas de PEG contendo o antibiótico, a mupirocina (exposição de 8 dias; Figura 6). Enquanto o cobre é conhecido por ser um agente antimicrobiano, é geralmente um inferior em comparação com antibióticos padrão. É, portanto, surpreendente que os complexos de hidroxipirona de cobre da presente invenção forneçam o mesmo resultado de soro como com a mupirocina nestes experimentos. Os presentes inventores acreditam que esta é uma consequência da combinação de complexos de hidroxipirona de cobre e PEG.

[0084] A Figura 7 mostra o aumento da eficácia ao longo do tempo, presumivelmente porque os conjuntos de pEG de maltol de cobre estão sendo formados na pomada (todos os porcos foram tratados a partir do lote de pomadas, mas houve um intervalo de pelo menos 2 semanas entre o porco 1 e o porco 3 sendo tratado).

[0085] A Figura 8 mostra que o silicato não interage com o maltol de cobre nas pomadas de PEG como evidência pelas taxas equivalentes de liberação de cobre.

[0086] Surpreendentemente, foi ainda notado que as pomadas de PEG contendo maltol de cobre se tornaram mais eficazes à medida que envelheceram mais do que 3 semanas após a preparação, elas pareceram mais eficazes do que após alguns dias de preparação no modelo porcino tal que as unidades formadoras de colônias de MRSA por grama de biópsia

de pele foram 1,6 log CFU/g versus 5,1 log CFU/g, respectivamente. Apesar de não quererem estar vinculados a qualquer teoria em particular, os autores acreditam que a associação entre os dois componentes se torna mais vantajosa para a atividade antimicrobiana tópica ao longo do tempo.

[0087] Vantajosamente, os presentes inventores observaram que a atividade antimicrobiana do maltol de cobre estende-se a outros complexos de hidroxipirona de cobre. O etilmaltol de cobre é particularmente vantajoso, uma vez que, tal como o maltol de cobre, pode ser utilizado em várias proporções de cobre: hidroxipirona e as suas propriedades antimicrobianas são retidas em ambientes ricos em proteínas.

[0088] Todos os documentos mencionados nesta especificação são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição antibacteriana **caracterizada** pelo fato de que compreende um polialquileno glicol e um complexo de hidroxipirona de cobre.

2. Composição antibacteriana, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o composto de hidroxipirona de cobre compreende maltol e/ou etilmaltol.

3. Composição antibacteriana, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a composição compreende pelo menos 10% (p/p) do polialquileno glicol, opcionalmente pelo menos 30% (p/p) do polialquileno glicol e opcionalmente pelo menos 50% (p/p) do polialquileno glicol.

4. Composição antibacteriana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que a pomada de PEG compreende maltol de cobre.

5. Composição antibacteriana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada** pelo fato de que os conjuntos de maltol-PEG de cobre protegem o maltol de cobre da degradação redox.

6. Composição antibacteriana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de que o polialquileno glicol é um ou mais polietileno glicóis (PEG) e/ou um ou mais polipropileno glicóis.

7. Composição antibacteriana, de acordo com a

reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o polialquilenoglicol compreende uma combinação de um ou mais polietileno glicóis e um ou mais polipropileno glicóis, tais como PEG 400, PEG 3350 e polipropileno glicol.

8. Composição antibacteriana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizada** pelo fato de que a composição é uma pomada ou creme.

9. Composição antibacteriana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada** pelo fato de que a proporção de cobre para maltol é entre 1:0,5 e 1:10, ou 1:1 e 1:5, ou 1:1 e 1:4.

10. Composição antibacteriana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de que a composição compreende uma composição de silicato.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que a composição de silicato é um nanossilicato.

12. Composição antibacteriana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizada** pelo fato de ser para uso em um método de tratamento de uma infecção microbiana.

13. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que a composição é para uso no tratamento de um indivíduo humano.

14. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que a composição é para uso no tratamento de um animal não humano.

15. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, **caracterizada** pelo fato de que a composição antibacteriana é administrada topicamente.

16. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que a composição é para uso veterinário.

17. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, **caracterizada** pelo fato de que a composição é para uso no tratamento de cães, gatos ou cavalos.

18. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, **caracterizada** pelo fato de que a composição é para o tratamento de uma infecção bacteriana.

19. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 18, **caracterizada** pelo fato de que a infecção bacteriana é causada por uma bactéria gram-negativa ou gram-positiva.

20. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com a reivindicação 18 ou 19,

caracterizada pelo fato de que a infecção bacteriana é tratamento de uma infecção por MRSA.

21. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 20, **caracterizada** pelo fato de ser para uso em um método para o tratamento de feridas.

22. Composição antibacteriana para uso em um método de tratamento, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, **caracterizada** pelo fato de que a infecção bacteriana é causada por uma *Escherichia sp.*, tal como *E. coli*, um *Staphylococcus sp.*, tal como *S. epidermis*, *S. aureus* ou *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("MRSA"), um *Bacillus sp.*, tal como *B. subtilis*, uma *Pseudomonas sp.*, tal como *P. aeruginosa*, um *Vibrio sp.*, tal como *V. fisheri*, um *Streptococcus sp.*, tais como *S. pyrogenes* e *S. pneumoniae*, uma *Klebsiella sp.*, um *Micrococcus sp.*, tal como *M. luteus*, um *Clostridium sp.*, tal como *C. difficile*, um *Acinetobacter sp.* tal como *A. baumannii*, um *Mycobacterium sp.*, tal como *M. tuberculosis* ou uma *Salmonella sp.*, uma *Clamídia sp.* ou espécies de fungos tal como *Candida sp.*, tal como *C. albicans*.

23. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de compreender a composição antibacteriana conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

24. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada** pelo fato de que a composição é formulada para administração tópica.

25. Uso de uma composição antibacteriana conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de infecção microbiana.

26. Método de tratar ou prevenir uma infecção microbiana, o método **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar a um paciente em necessidade de tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição antibacteriana conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

27. Composição para uso em um método de tratamento, o uso ou o método conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 12 a 22, 25 ou 26, **caracterizado(a)** pelo fato de que a composição é formulada para administração tópica, mais preferencialmente para aplicação na pele de um indivíduo.

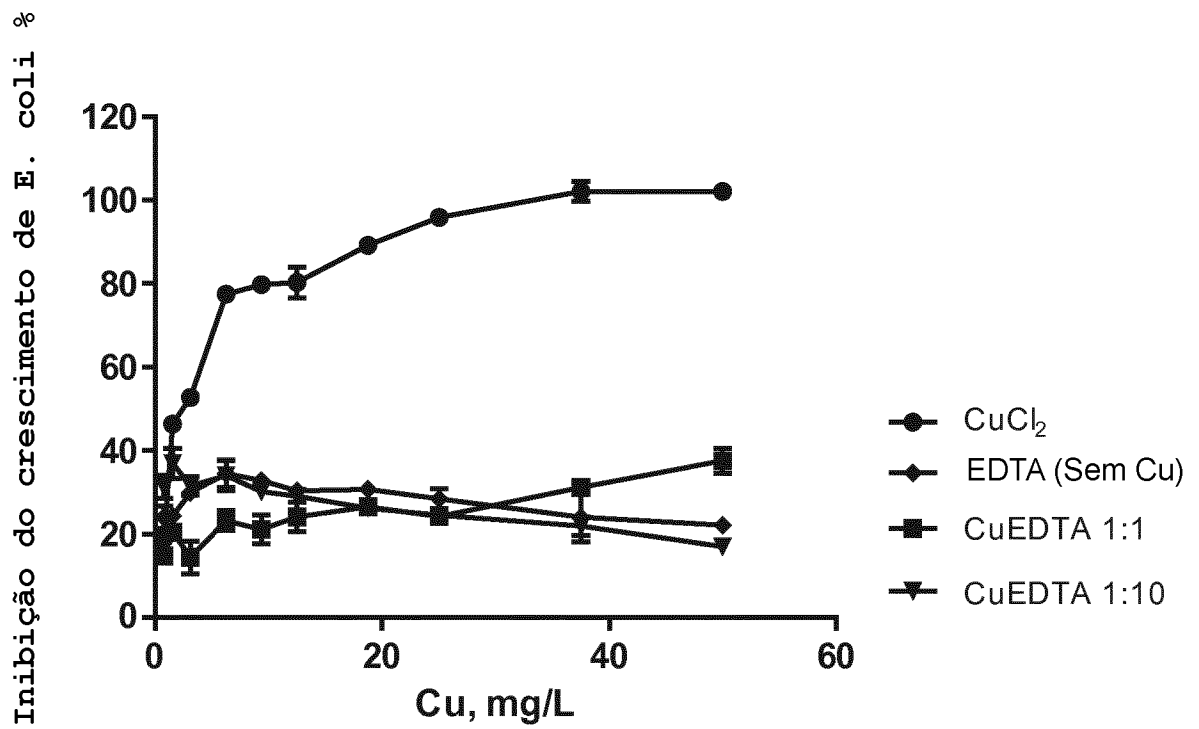


FIG. 1

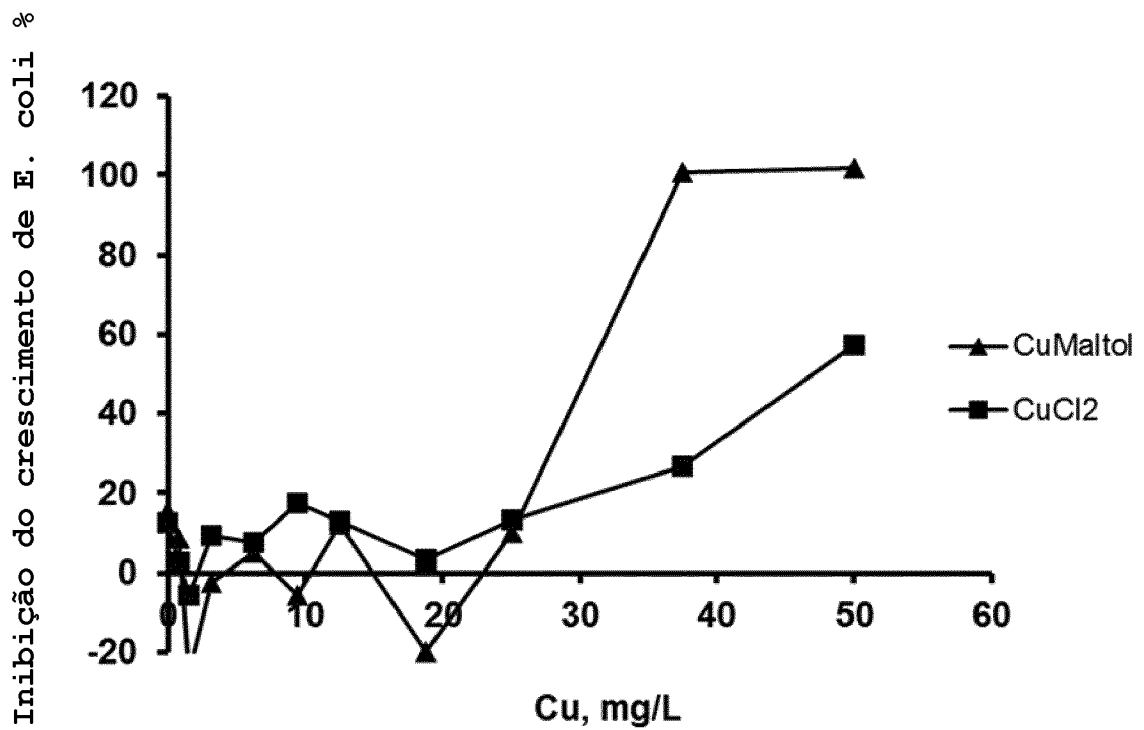


FIG. 2

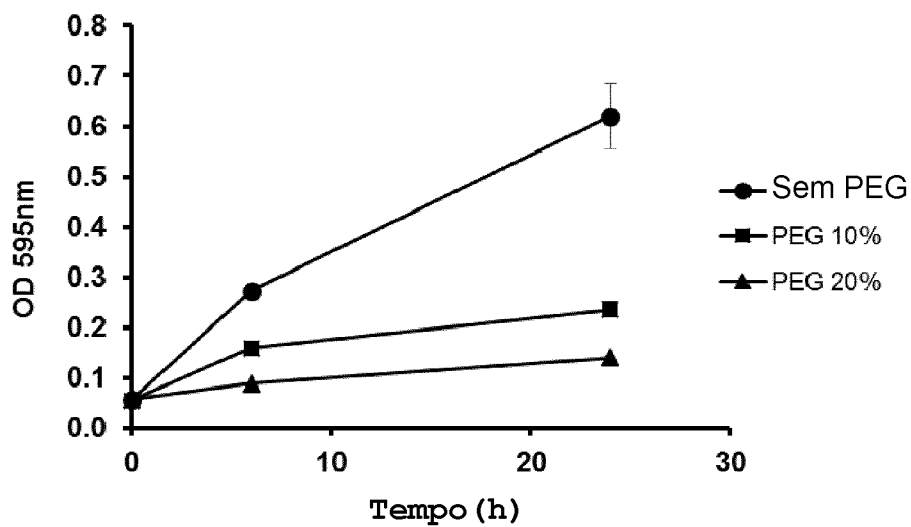


Figura 3

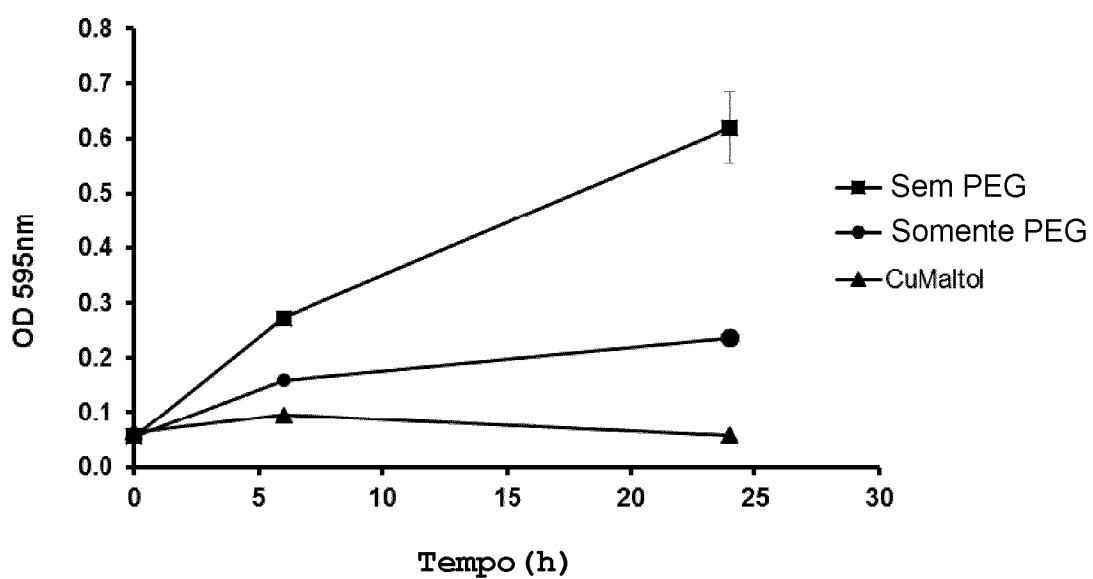


Figura 4

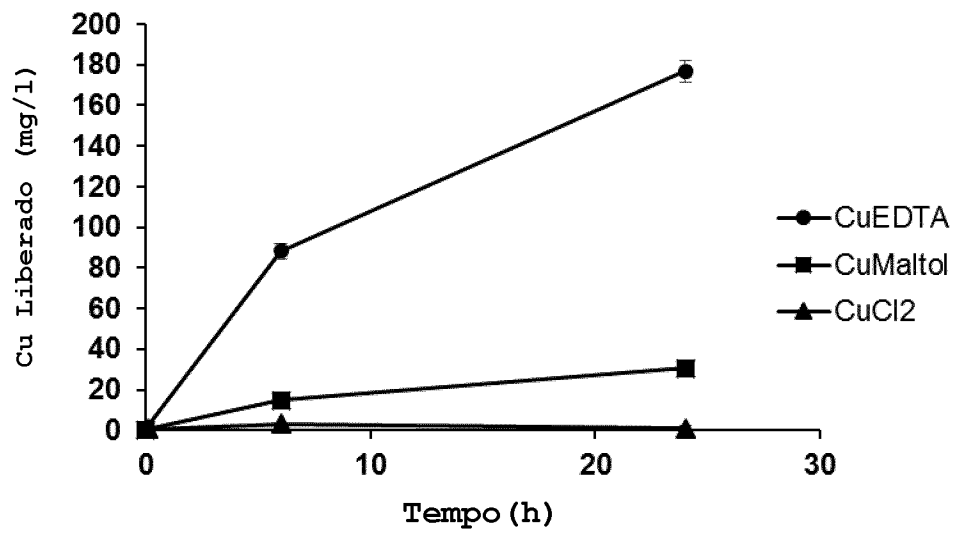


Figura 5

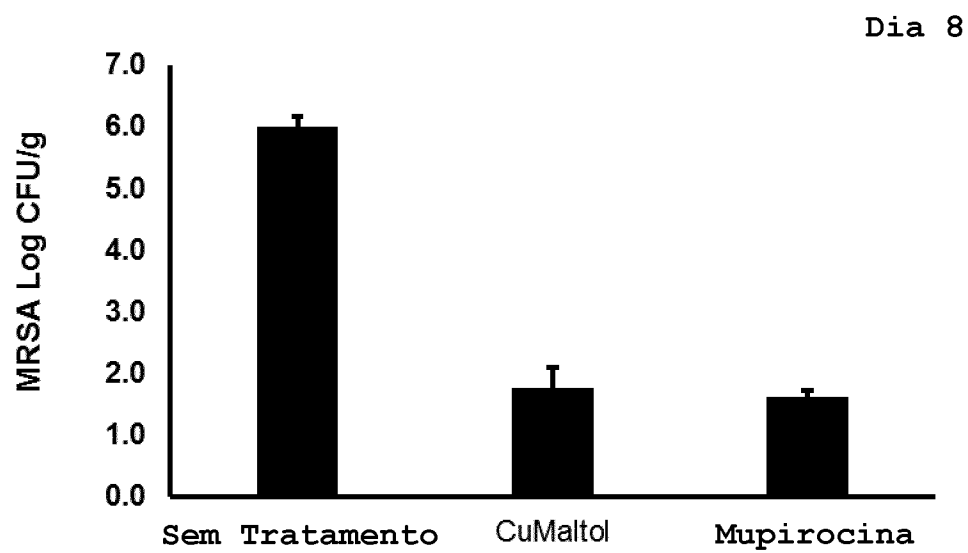


Figura 6

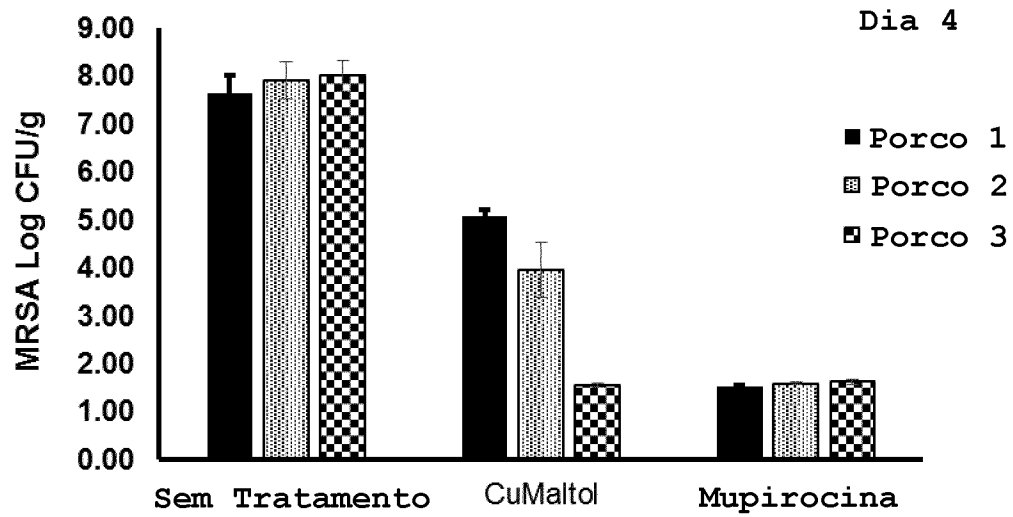


Figura 7

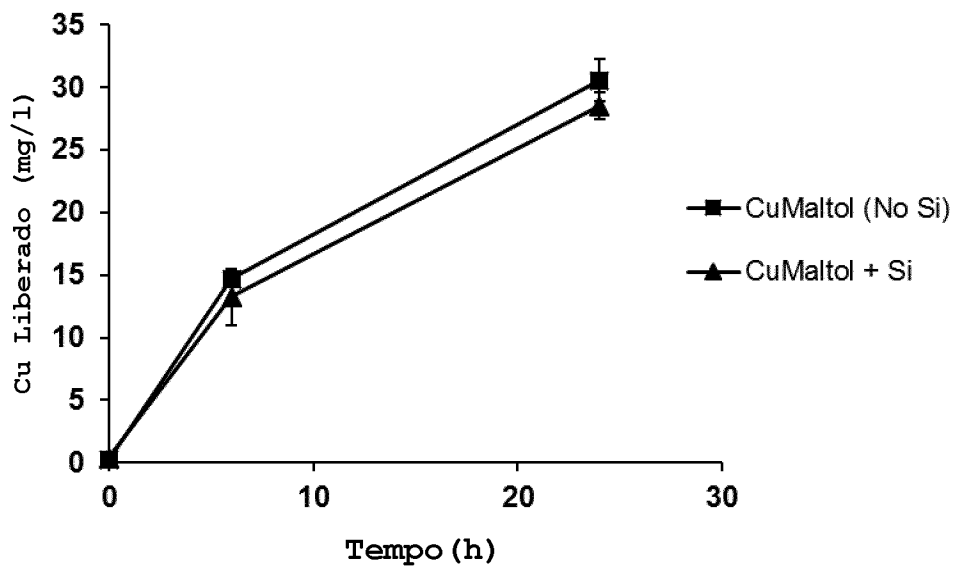


Figura 8

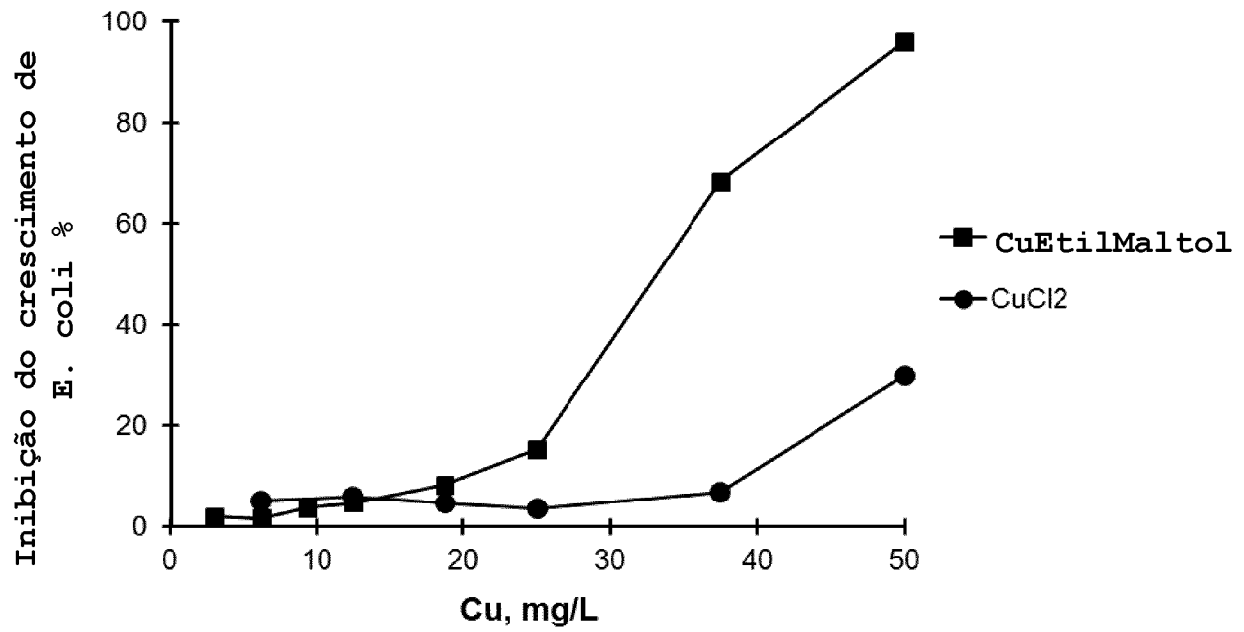


Figura 9

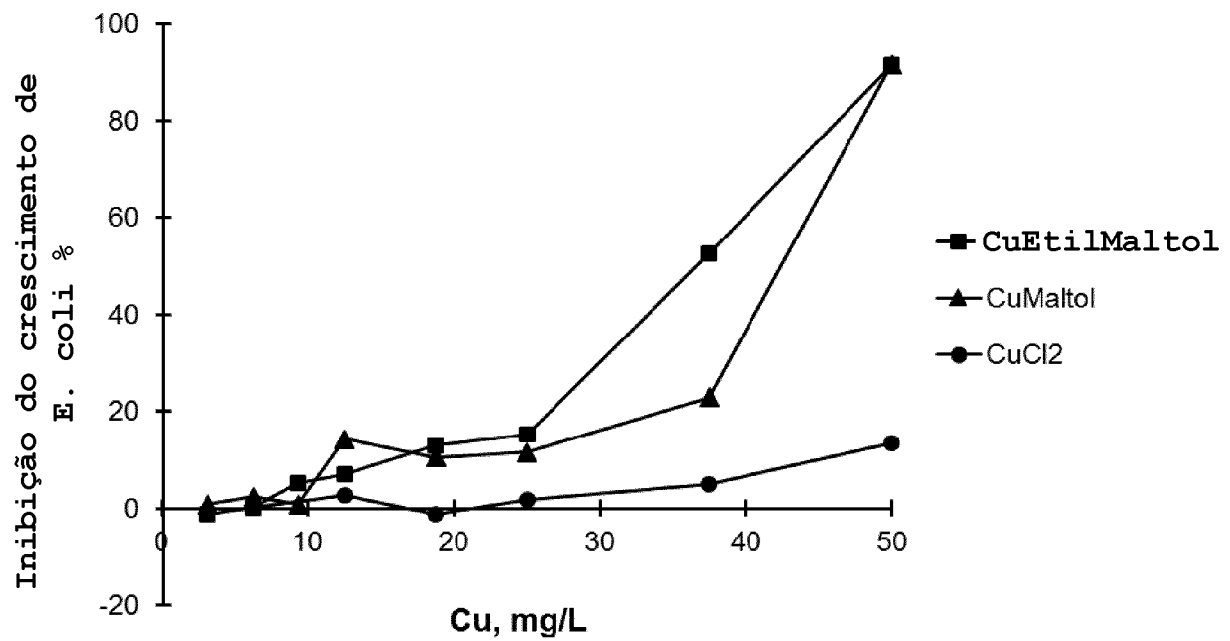


Figura 10

Resumo da Patente de Invenção para: **"COMPOSIÇÕES
ANTIMICROBIANAS COMPREENDENDO COMPLEXOS DE COBRE-
HIDROXIPIRONA"**

São descritos agentes antibacterianos à base de cobre com base em complexos de cobre anfifílicos formados entre o cobre e as hidroxipironas, tal como o maltol. Em outros aspectos, a presente invenção se refere a pomadas à base de PEG mostrando que elas são particularmente eficazes para administração tópica de complexos anfifílicos de cobre. Em particular, as pomadas de PEG mostraram limitar o crescimento bacteriano, mesmo quando na ausência do agente de cobre. No entanto, este efeito bacteriostático é mostrado aqui para se tornar um verdadeiro efeito biocida quando as hidroxipironas de cobre são adicionadas ao PEG.