

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SUPERFÍCIES POLIMÉRICAS
FUNCIONALIZADAS COM FOTOSSENSIBILIZADORES, MATERIAL
POLIMÉRICO FUNCIONALIZADO E SEU USO

Campo da invenção

[1] A presente invenção se aplica na área de funcionalização de polímeros, sendo essencialmente composta por um processo de ligação de moléculas fotossensibilizadoras a superfícies poliméricas, cada uma delas contendo as funcionalidades químicas apropriadas para estabelecer ligações químicas covalentes, termodinamicamente estáveis, originando produtos constituídos de um par Material Polimérico Fotossensibilizador (MPn-PSm). Estes materiais funcionalizados, no escuro, ou, preferencialmente quando iluminados com comprimentos de onda adequados promovem ação fotodinâmica, evitando a formação de colônias microbianas na superfície, ao mesmo tempo que eliminam micro-organismos presentes no meio e em contato com tais superfícies.

[2] De forma mais específica, aplica-se aos dispositivos biomédicos de natureza polimérica utilizados no apoio à vida, como por exemplo tubo endotraqueal, cateteres, sondas, reservatórios, luvas, cânula de traqueostomia, escalpe de infusão intravenosa, cateter nasal para oxigênio, sonda para aspiração traqueal, com e sem válvula, embalagens e sacos de armazenamento instrumental.

Fundamentos da invenção

[3] Pacientes imunossuprimidos portadores destes dispositivos em ambiente hospitalar são, em geral, submetidos a procedimentos padrão envolvendo o uso de antibióticos para controle de infecções conduzindo, na

maioria dos casos, ao desenvolvimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos existentes no mercado.

[4] O tubo endotraqueal é um exemplo de dispositivo rotineiro para auxílio de respiração mecânica em pacientes com problemas respiratórios, traumas pós-operatórios ou pós-traumáticos, que em sua superfície corriqueiramente há o desenvolvimento de colônias microbianas e, na maioria dos casos, conduz ao quadro de Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica. Dados relatados por Zeitoun, S.S. et al. (2001) referem que pacientes entubados apresentam um risco de vida resultantes de infecções microbianas 21 vezes maior quando comparado com pacientes não entubados, sendo uma das principais causas de morte destes pacientes entubados.

[5] As bolsas de sangue são outro exemplo de dispositivos utilizado para transportar e armazenar o sangue do doador até este ser necessário para uma transfusão. As contaminações contraídas em transfusões são muito graves, uma vez que podem provocar uma infecção generalizada no paciente.

[6] O transporte de órgãos para transplantes deve ser realizado em embalagem que não gere risco de contaminação microbiana ou altere a integridade do órgão, sendo então de máxima importância garantir condições assépticas nos dispositivos médicos para transporte e armazenamento de órgãos.

[7] A presente invenção descreve o processo de ligação de fotossensibilizadores (PS) dos grupos curcumina e derivados (PS1) porfirina e derivados (clorina e bacterioclorina) (PS2 e PS3) contendo cada componente o grupo nucleofílico apropriado para estabelecer uma ligação química

covalente estável (éter, amina, tioéter) com superfícies poliméricas (MP1 e MP2) contendo grupos funcionais (X) apropriados gerando produtos do tipo (MPn-PSm).

[8] Os produtos (MPn-PSm) desenvolvidos na presente invenção são estáveis em soluções aquosas de diferentes pH à temperatura fisiológica e após irradiação com luz de comprimento de onda apropriado.

[9] Os produtos constituídos pelas superfícies poliméricas funcionalizadas com fotossensibilizadores (PS) ligados covalentemente (MPn-PSm) evitam o desenvolvimento destas infecções por micro-organismos na ausência de luz, reduzindo o risco de morte. Enquanto que, na presença de luz com comprimento de onda apropriado, tais produtos inativam a formação de micro-organismos e de biofilmes por ação fotodinâmica, reduzindo o número de mortes causadas por infecções microbianas multirresistentes aos antibióticos existentes no mercado.

Estado da técnica

[10] A inativação de micro-organismos por terapia fotodinâmica (TFD) envolve a presença de três componentes: fotossensibilizador (PS), fonte de luz de comprimento de onda apropriado e oxigênio.

[11] Um fotossensibilizador (PS) é uma entidade química que absorve luz em comprimento de onda específico, alterando as suas propriedades químicas e/ou físicas. Os fotossensibilizadores (PSs) absorvem energia da luz transitando para um estado excitado e, conseqüentemente, transferindo energia. O PS pode atuar por diferentes mecanismos: tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I, os fotossensibilizadores (PSs) reagem diretamente com moléculas

para produzir radicais livres ativos (ROS) e íons radicais. No mecanismo tipo II ocorre transferência de energia para o oxigênio molecular, produzindo oxigênio singlete capaz de inativar micro-organismos (Pucelik et al. (2018) (Plos One, 13(1): e0191777).

[12] Entretanto, o desenvolvimento de resistência microbiana resultante da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por ação fotodinâmica (TFD) não foi relatada até ao momento.

[13] Bezman et al. (1978) (Photochemistry and Photobiology, 28, 325-329, 1978) divulgaram a inativação fotodinâmica de *Escherichia coli* utilizando o fotossensibilizador (PS) Rosa Bengala ligado covalentemente por ligação do tipo éster a esferas de um copolímero de poliestireno com clorometil estireno. Esta ligação covalente do tipo éster é susceptível de sofrer hidrólise em meios biológicos e por ação da luz. Já o processo de preparação e os produtos do tipo MPn-PSm descritos na presente invenção envolvem diferentes fotossensibilizadores (PS), contendo as funcionalidades selecionadas (NH₂, OH, SH) para formar uma diferente ligação covalente estável (tipo amina, éter e tioéter) com diferentes polímeros, incluindo o PVC e Merrifield, estáveis em meios biológicos e por irradiação com luz.

[14] A patente WO 1993/000815 divulga composições fotobactericidas que compreendem um polímero do tipo fibra têxtil (celulose) e um fotossensibilizador (porfirina ou ftalocianina) ligados apenas por interação eletrostática, aplicados para esterilização de superfícies. Os fotossensibilizadores usados são do tipo meso-tetrapiridil

porfirina ou ftalocianina não funcionalizadas e estão apenas adsorvidos aos polímeros por ligações eletrostáticas.

[15] Nos documentos EP1203052/US6420455B1 revela-se uma composição polimérica e artigos que utilizam tal composição, que apresenta atividade antimicrobiana superficial. No entanto, não há menção à presença de ligações covalentes com os agentes fotossensibilizadores, sendo ao menos um deles o xanteno. A interação do fotossensibilizador com o material polimérico é puramente física (mistura física) com algumas interações eletrostáticas, sem formação de interações essencialmente químicas. Embora seja mencionado naquele documento o efeito dos agentes mesmo em períodos com ausência de estímulo luminoso, as diferenças evidenciam-se no que se refere ao nível de interação, visto que a funcionalização da superfície proposta na presente invenção, envolve a promoção das características biológicas superficiais, no entanto, mantendo os requisitos mecânicos e de outras funcionalidades do material polimérico base.

[16] No documento RU 2663061 apresenta-se um agente antimicrobiano à base de polímeros para conferir propriedades bactericidas, cujas moléculas contêm pelo menos um átomo de nitrogênio com um par de elétrons livres, de modo que o biocida esteja coordenado por uma ligação instável do tipo eletrostática a um complexo metálico, que pode conter porfirina de magnésio como átomo central, além de outros grupos químicos tais como ftalocianina. A única similaridade consiste na aplicação de fotossensibilizadores do tipo porfirina, mas com estruturas e consequentemente propriedades fotodinâmicas diferentes das descritas na presente invenção. Além disso, o objetivo da referida

invenção em relação aos polímeros utilizados não é a funcionalização da superfície de dispositivos biomédicos utilizando ligação covalente.

[17] A novidade da presente invenção baseia-se na funcionalização de superfícies poliméricas do tipo policloreto de vinila, halometilpoliestireno ou copolímeros destes, contendo grupos abandonadores (Br, Cl, I ou F), em particular, PVC (MP1) ou Merrifield (MP2) contendo grupos abandonadores cloro (Cl), que se ligam com fotossensibilizadores. Estes compostos contém os grupos funcionais apropriados (OH, N- ou SH), e, por meio da formação de ligações covalentes estáveis, tanto em meios biológicos como na presença de luz, são formados produtos do tipo MPn-PSm, que, quando irradiados com luz de comprimento de onda apropriado, possuem aplicação como dispositivos biomédicos de ação antimicrobiana.

[18] Salienta-se ainda que o material obtido por meio do processo desta invenção pode diminuir significativamente o risco de infecções e pneumonias de pacientes hospitalizados e entubados. O material polimérico funcionalizado covalentemente com fotossensibilizadores (PS) tem a capacidade de promover, portanto, uma melhoria no ambiente hospitalar, trazendo elevados benefícios para a saúde pública.

Breve descrição da invenção

[19] A presente invenção descreve um processo de preparação de um produto polimérico (MPn-PSm) constituído por polímeros ou co-polímeros contendo grupos funcionais apropriados. Os produtos poliméricos (MPn-PSm) desenvolvidos na presente invenção diminuem o crescimento microbiano na

ausência de luz e exibem atividade antimicrobiana quando expostos à luz com um comprimento de onda apropriado. Os materiais poliméricos (MPn-PSm) ligados por ligação covalente irreversível aos fotossensibilizadores (PSm) são particularmente relevantes para inativação microbiana de dispositivos médicos, tubo endotraqueal, embalagens para armazenamento e transporte de órgãos, bolsas para armazenamento e transporte de sangue, embalagens para armazenamento e transporte de alimentos, entre outras.

Breve descrição das figuras

[20] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras às quais se faz referências, conforme se segue:

Na Figura 1 representa-se um esquema da funcionalização do material polimérico (MPn) contendo um grupo abandonador (X), que pode ser um átomo de halogênio, reagindo com um fotossensibilizador (PSm) que pode ser do tipo curcumina e derivados ou macrociclo tetrapirrólico mais concretamente porfirina e derivados (clorina ou bacterioclorina) contendo um grupo nucleofílico (Y), que pode ser do tipo -OH, -N- ou -SH, originando um material polimérico funcionalizado designado por (MPn-PSm).

[21] Na Figura 2 representa-se um gráfico com os dados de um exemplo de caracterização por UV-Vis comparando-se com o material polimérico (MP1) (curva preta) e o fotossensibilizador curcumina (PS1) (curva azul) em separado, como tubo endotraqueal funcionalizado com o fotossensibilizador curcumina (MP1-PS1) (curva verde).

[22] Na Figura 3 representa-se um exemplo de caracterização por espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

do tubo endotraqueal (TE) sem funcionalização (curva preta), em relação à curcumina (PS1) (curva vermelha) e o tubo endotraqueal funcionalizado (PVC-curcumina, MP1-PS1) (curva azul). A análise de caracterização do tipo espectroscopia do infravermelho foi medida em um intervalo entre 500-4000 cm^{-1} no espectrofotômetro equipado com uma Smart Orbit accessory.

[23] Na Figura 4 representa-se um exemplo de caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): (a) tubo endotraqueal composto pelo material polimérico no estado sólido (MP1); (b) tubo endotraqueal composto pelo material polimérico funcionalizado (MP1) ligado covalentemente à curcumina (PS1) (MP1-PS1). As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 15kV, corrente de 2,82A e I probe de 200pA. As amostras foram recobertas com 6nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente = 60mA; taxa de deposição 0,60nm/s.

[24] Na Figura 5 representa-se um exemplo de caracterização por espectroscopia de fluorescência do tubo endotraqueal composto pelo material funcionalizado por ligação covalente (MP1-PS1) a uma faixa de 350-600nm de comprimento de onda de excitação; a) A imagem de fluorescência foi obtida da superfície exterior do tubo endotraqueal funcionalizado (MP1-PS1);

[25] Na Figura 6 representa-se graficamente o resultado

da análise microbiológica da redução de biofilme de *Staphylococcus aureus* no tubo endotraqueal funcionalizado com curcumina por ligação covalente MP1-PS1; Laranja (///) representa-se a redução em % do crescimento de bactérias nos biofilmes na superfície do tubo endotraqueal TE (controle) e do tubo endotraqueal funcionalizado com curcumina por ligação covalente MP1-PS1 (Laranja), no escuro; Vermelho(///)- redução em % do crescimento de bactérias nos biofilmes na superfície do tubo endotraqueal TE (controle) e do tubo endotraqueal funcionalizado com curcumina por ligação covalente MP1-PS1 (Vermelho) após irradiação com uma fonte de luz proveniente de um LED na região de 450 nm, durante 12 minutos, totalizando 50 J/cm².

[26] Na Figura 7 apresentam-se gráficos com o espectro de UV-Vis da solução onde foi imerso o material polimérico MP1-PS1 em diferentes condições de pH (2, 7 e 10).

Descrição detalhada da invenção

[27] A presente invenção relaciona-se com a funcionalização de materiais poliméricos, ou copolímeros, por ligação covalente com fotossensibilizadores (PSs), que exibem atividade antimicrobiana no escuro, ou preferencialmente quando expostos à luz (TFD) contribuindo para a diminuição da aderência e inativação de micro-organismos em dispositivos biomédicos construídos com esses materiais. Estes polímeros são preferencialmente da classe dos polihaleto de vinila, sendo que haleto ou halogênios são moléculas diatômicas dos elementos do grupo 17 da tabela periódica, contendo grupos abandonadores Flúor (F), Cloro (Cl), Bromo (Br) ou Iodo (I), preferencialmente Cloro (Cl).

[28] Na presente invenção são descritos processos de

obtenção de superfícies poliméricas funcionalizadas (MPn-PSm), a partir dos polímeros ou copolímeros com funcionalizações apropriadas (X), que podem ser um halogênio ou um grupo abandonador, em particular, policloreto de vinila (MP1) e (clorometil)poliestireno-merrifield (MP2), e dos fotossensibilizadores (PSs) do tipo curcumina e derivados (PS1), meso-tetra aril porfirinas e derivados, clorinas e bacterioclorinas halogenadas e funcionalizadas com grupos nucleofílicos (PS2), em particular incluindo as do tipo meso-imidazoil-porfirinas e derivados (clorinas e bacterioclorinas) (PS3). Todos os fotossensibilizadores (PSs) da presente invenção incorporam na sua estrutura o grupo funcional (Y), sendo este um nucleófilo do tipo OH, SH ou NH₂.

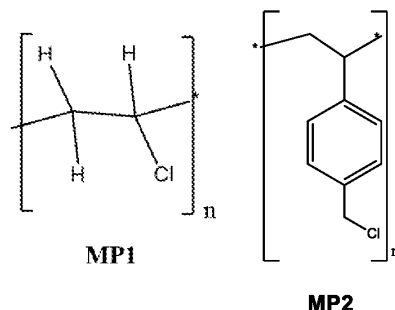
[29] Ou seja, a presente invenção descreve o processo de ligação covalente (D) do tipo éter, amina ou tioéter dos PSs: PS1, PS2 e PS3 aos materiais poliméricos funcionalizados MP1 e MP2, através de uma reação de substituição nucleofílica para preparar os produtos MPn-PSm. Além disso, envolve igualmente a aplicação dos produtos poliméricos MPn-PSm obtidos na diminuição da aderência de microrganismos e na inativação dos micro-organismos por ação fotodinâmica (TFD), nomeadamente em: sondas, cateteres, reservatórios, cânula de traqueostomia, scalp de infusão intravenosa, cateter nasal para oxigênio, cateter de hemodiálise, sonda retal, embalagens para transporte e armazenamento de órgãos, sonda uretral, sonda para aspiração traqueal, usados em ambiente hospitalar por humanos e animais.

[30] Os produtos formados pelas superfícies poliméricas MPn-PSm desenvolvidas na presente invenção evitam a

proliferação microbiana, que é a causa de inúmeras infecções graves, sendo atualmente um dos principais motivos de morte em pacientes hospitalizados que utilizam estes dispositivos. Adicionalmente estes materiais poliméricos MPn-PSm têm importante aplicação na preparação de embalagens para armazenamento de alimentos.

[31] O processo ora proposto é simples e economicamente eficiente para obtenção de materiais poliméricos funcionalizados com fotossensibilizadores do tipo MPn-PSm (com n de 1 a 2 e m de 1 a 3, nomeadamente MP1-PS1; MP1-PS2; MP1-PS3; MP2-PS1; MP2-PS2 e MP2-PS3 (conforme tabela 1) obtidos através da reação de substituição nucleofílica direta entre os materiais poliméricos tipo MP1 ou MP2, obtidos comercialmente, contendo na sua estrutura grupos abandonadores em particular halogênios (flúor, cloro, bromo ou iodo,) e cada um dos fotossensibilizadores do tipo PS1, PS2 ou PS3 contendo os grupos nucleofílicos OH, SH ou N-.

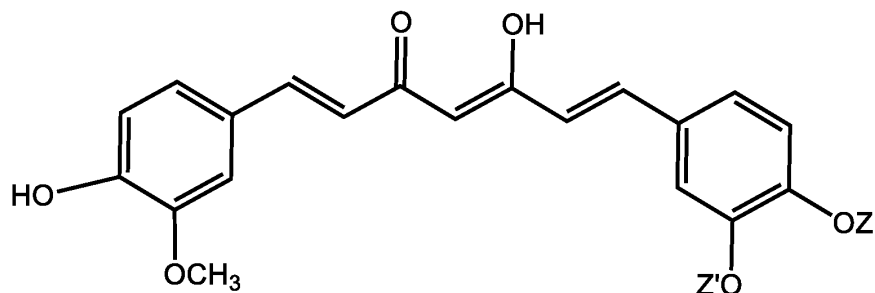
[32] A estrutura dos materiais poliméricos MP1 (Policloreto de vinila (PVC) de fórmula geral $[C_2H_3Cl]_n$) ou MP2 ((Clorometil) poliestireno de fórmula geral $[C_9H_9Cl]_n$) permite identificar facilmente a presença dos grupos abandonadores halogênios:



Origem dos fotossensibilizadores

[33] O fotossensibilizador PS1 com grupos nucleofílicos

do tipo hidroxila com a função de nucleófilo, designado pelo nome trivial curcumina e de nome IUPAC (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxí-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, e seus derivados:



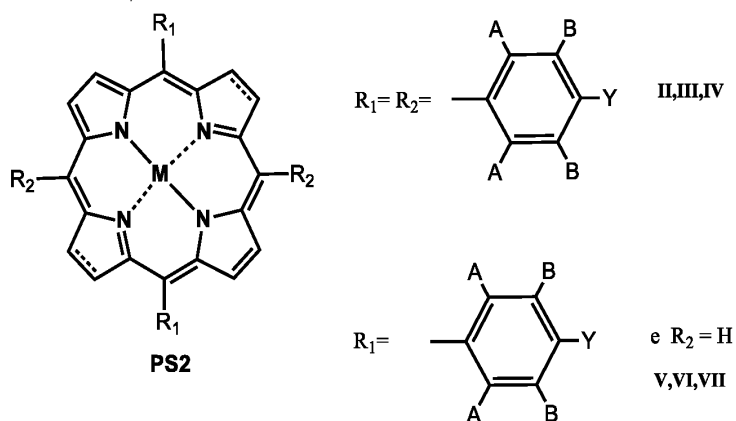
PS1

[34] Os fotossensibilizadores das famílias PS2 e PS3, englobam porfirinas funcionalizadas com grupos nucleofílicos do tipo hidroxila, amina ou tiol (fórmulas II a IX; com as duas posições beta pirrólicas (---) na forma de ligações duplas) e os seus derivados reduzidos clorinas (com uma posição (---) na forma de ligação simples e a outra (---) na forma de ligação dupla) e bacterioclorinas (com as duas posições (---) na forma de ligações simples).

[35] As porfirinas simétricas (fórmulas II a IV) com as duas posições (---) na forma de ligações duplas) foram sintetizadas seguindo o método do nitrobenzeno ou nitrobenzeno-NaY que consiste na mistura de 4 equivalentes do aldeído halogenado contendo o nucleófilo y (OH, N- ou SH) em uma das outras posições, com uma estrutura selecionada, com pirrol em condições aeróbicas, usando como solventes uma mistura de ácido acético ou ácido propiónico e nitrobenzeno sem ou com catalisador reutilizável, do tipo zeólito NaY, entre 100 a 140 °C.

[36] Após a filtração do NaY a quente, as porfirinas

precipitaram diretamente do meio da reação, após arrefecimento, ou por adição de metanol, ou foram purificadas por cromatografia flash, obtendo-se os fotossensibilizadores simétricos da família PS2 (fórmulas II-IV). As porfirinas não-simétricas halogenadas (fórmulas V a VII) com as duas posições (---) na forma de ligações duplas) foram sintetizadas seguindo o método do nitrobenzeno ou nitrobenzeno-NaY que consiste na mistura de 2 equivalentes do aldeído halogenado contendo o nucleófilo y (OH, N- ou SH) em uma das outras posições, com uma estrutura selecionada, com 2 equivalentes de formaldeído ou respectivo acetal, com 4 equivalentes de pirrol, em condições aeróbicas, usando como solventes uma mistura de ácido acético ou ácido propiônico e nitrobenzeno sem ou com catalisador reutilizável, do tipo zeólito NaY, entre 100 a 140 °C. Após a filtração do NaY a quente, as porfirinas foram purificadas por cromatografia preparativa flash, obtendo-se os fotossensibilizadores não-simétricos da família PS2 (fórmulas V-VII):

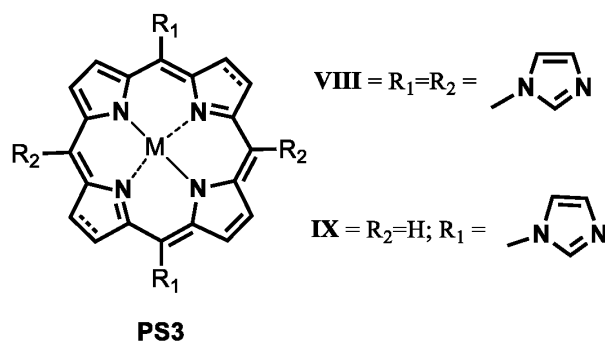


--- representa uma ligação carbono-carbono simples ou dupla

[37] A síntese das porfirinas simétricas (fórmulas VII com as duas posições (---) na forma de ligações duplas) foram

sintetizadas seguindo o método do nitrobenzeno ou nitrobenzeno-NaY que consiste na mistura de 4 equivalentes de 1-metil-2-imidazolcarboxaldeído com 4 equivalentes de pirrol, em condições aeróbicas, usando como solventes uma mistura de ácido acético ou propiônico e nitrobenzeno sem ou com catalisador reutilizável do tipo zeólito NaY, entre 100 a 140 °C. Após a filtração do NaY a quente, a porfirina (Fórmula VIII) foi purificada por cromatografia flash.

[38] A síntese da porfirina não-simétrica (fórmulas IX) com as duas posições (---) na forma de ligações duplas) foram sintetizadas seguindo o método do nitrobenzeno ou nitrobenzeno-NaY que consiste na mistura de 2 equivalentes de 1-metil-2-imidazolcarboxaldeído com 2 equivalentes de formaldeído ou o seu acetal, com 4 equivalentes de pirrol, em condições aeróbicas, usando como solventes uma mistura de ácido acético ou propiônico e nitrobenzeno sem ou com catalisador reutilizável do tipo zeólito NaY, entre 100 a 140° C. Após a filtração do NaY a quente, a porfirina (Fórmula IX) foi purificada por cromatografia flash.



----- representa uma ligação carbono-carbono simples ou dupla

[39] Os complexos metálicos dos PSs porfirínicos do tipo PS2 ou PS3 (Fórmulas II a VII; VIII e IX), foram preparados através da mistura de uma solução das respectivas

porfirinas dissolvidas em solvente apropriado preferencialmente em clorofórmio ou DMF, à qual se adiciona uma solução saturada do sal metálico apropriado ($\text{Zn}(\text{OAc})_2$, $\text{Pd}(\text{Oac})_2$ ou AlCl_3 , entre 40 e 150 °C. Após conclusão da reação de complexação, a mistura reacional foi purificada por lavagens sucessivas com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e água. Quando necessário, o complexo metálico foi purificado por cromatografia flash.

[40] As correspondentes clorinas com uma posição (---) na forma de ligação simples e a outra (---) na forma de ligação dupla foram sintetizadas segundo o método descrito por Pereira M.M. et al, em que um dos precursores do tipo porfirina (fórmulas II a IX), preparados de acordo com o processo acima referido, foi misturado no estado sólido com um pequeno excesso de *p*-toluenosulfonilhidrazina (15 equivalentes) em um tubo de Schlenk, e em seguida, colocado sob vácuo a 0,1 bar por 1 hora. Em seguida, a mistura é aquecida a entre 120 e 140 °C durante o tempo otimizado para cada substrato. A mistura reacional foi dissolvida em uma quantidade mínima de um solvente orgânico e lavado sequencialmente com hidróxido de sódio e água. O sólido obtido foi dissolvido em DME e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 equiv.) foi adicionado à solução, seguido por adição lenta de peróxido de hidrogênio (3% em água). A reação foi terminada quando se observou o desaparecimento do pico de absorção da bacterioclorina (≈ 750 nm). As correspondentes clorinas (Fórmula II a VII com uma posição (---) na forma de ligação simples e a outra (---) na forma de ligação dupla) foram purificadas por lavagens seguidas de cromatografia flash.

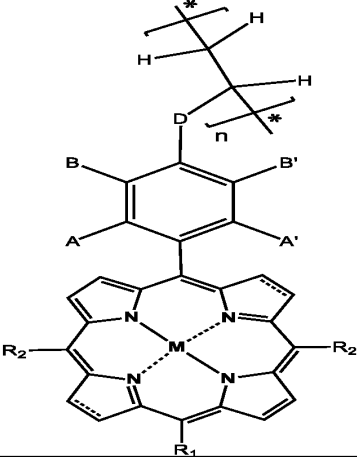
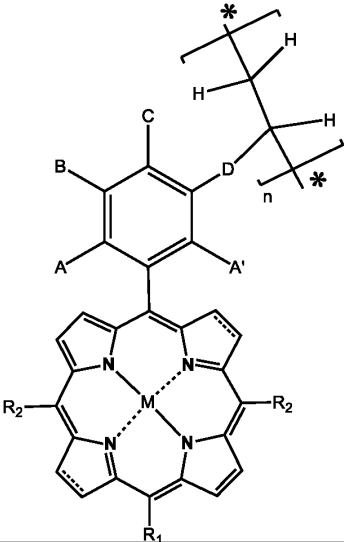
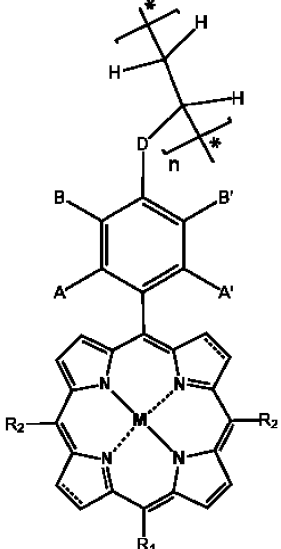
[41] As correspondentes bacterioclorinas com as duas

posições (---) na forma de ligações simples dos PS2 e PS3 foram sintetizadas segundo o método descrito por Pereira M.M. et al, em que a porfirina é misturada com um excesso de *p*-toluenosulfonilhidrazina (40 equivalentes) em um tubo de schlenk, e em seguida, colocado sob vácuo (0,1 bar) por 1 hora. Em seguida, a mistura é aquecida a 140 °C durante o tempo otimizado para cada porfirina (Fórmula II a VII onde (---) é uma ligação dupla). Após arrefecer à temperatura ambiente, as correspondentes bacterioclorinas (Fórmula II a IX onde (---) é uma ligação simples) são purificadas por lavagens ou por cromatografia flash.

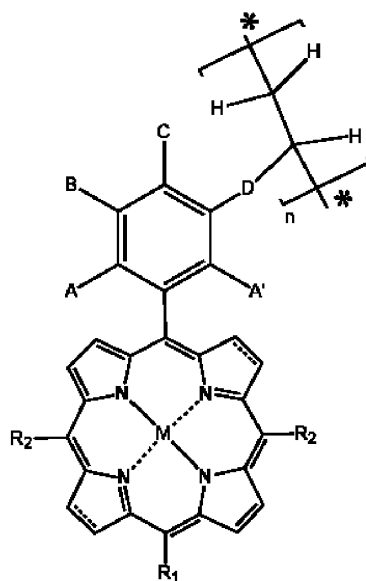
[42] Na tabela 1 aborda-se todas as combinações possíveis de materiais poliméricos e fotossensibilizadores (MPn-PSm) e suas estruturas possíveis, sendo que o componente D é sempre uma ligação covalente éter (O), tioéter (S) ou uma ligação amina (N-) (Tabela 1):

Tabela 1 - combinações possíveis de materiais poliméricos e fotossensibilizadores (MPn-PSm) e suas estruturas possíveis

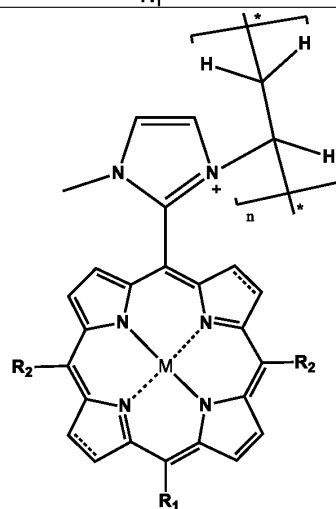
Ref.	Estrutura química
MP1-PS1	

MP1-PS2 (II e III)	
MP1-PS2 (IV)	
MP1-PS2 (V e VI)	

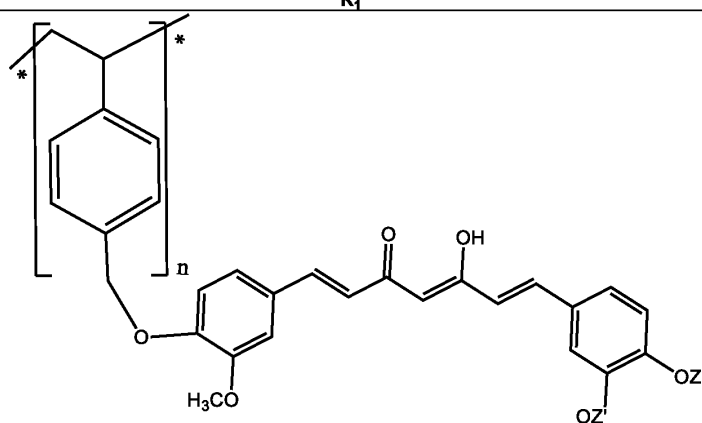
MP1-PS2
(VII)



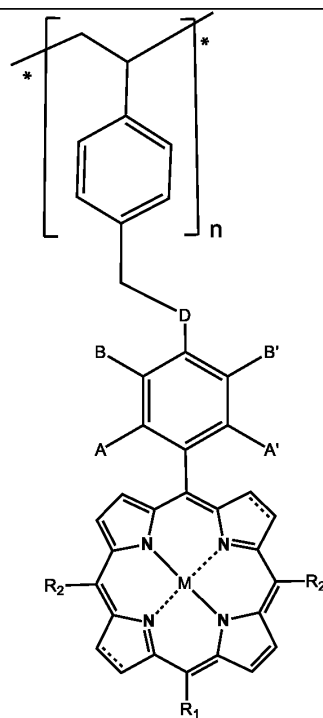
MP1-PS3
(VIII e IX)



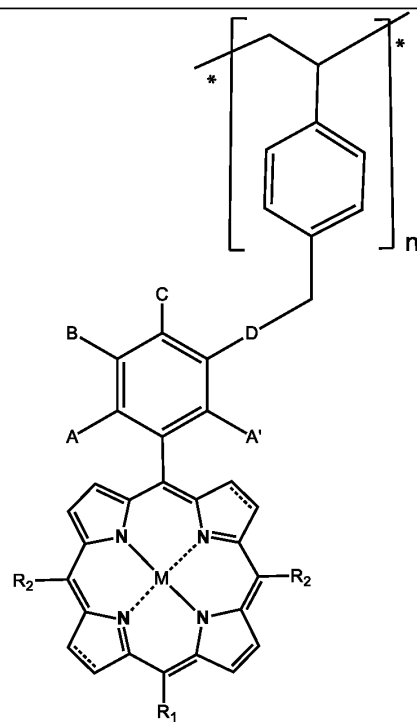
MP2-PS1



MP2-PS2
(II e III)

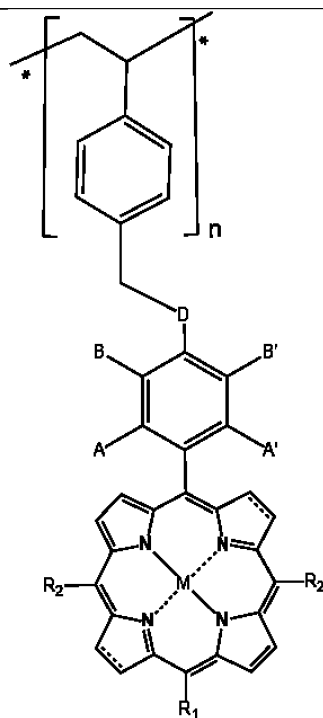


MP2-PS2
(IV)



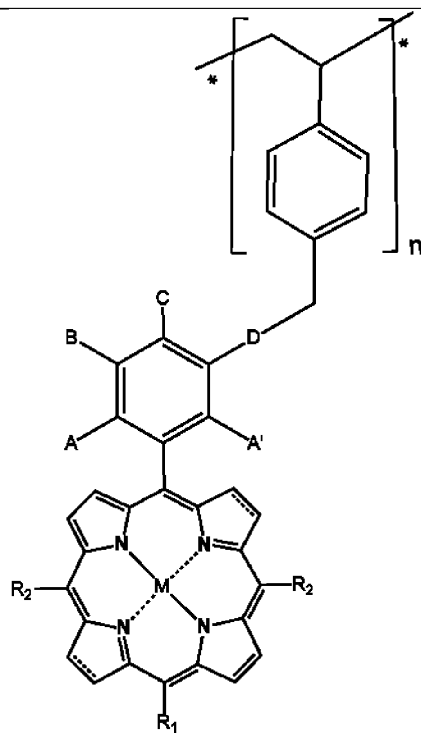
MP2-PS2

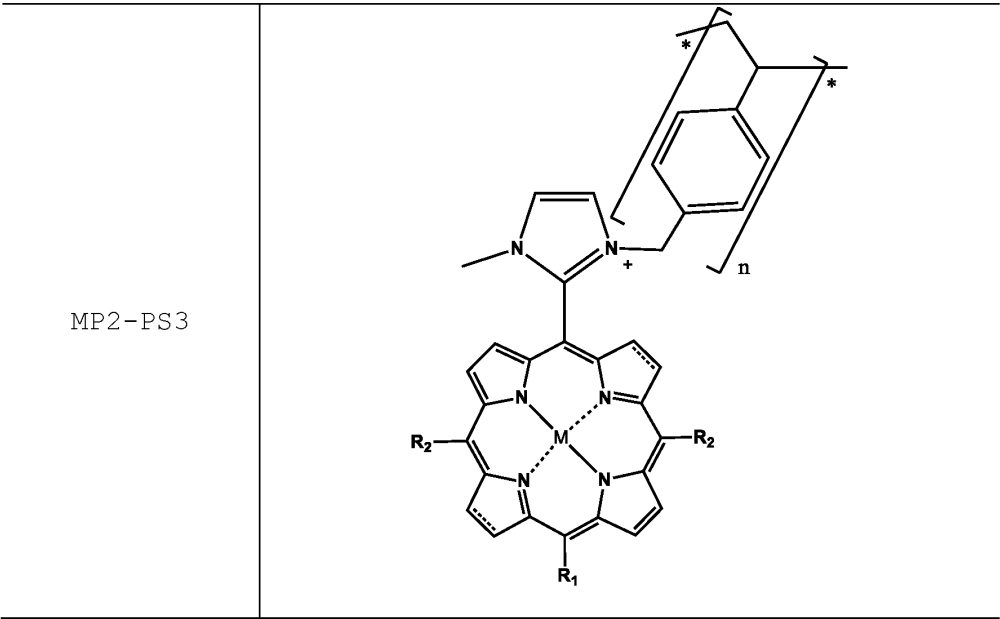
(V e VI)



MP2-PS2

(VII)

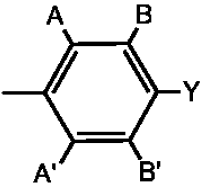
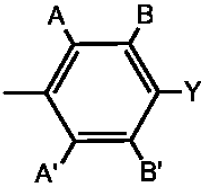
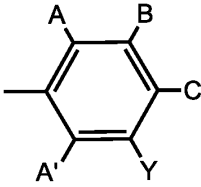
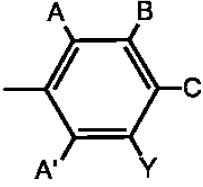
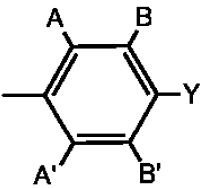


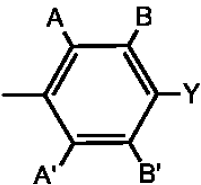
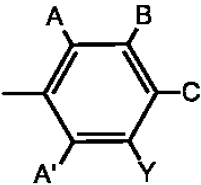
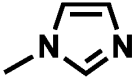
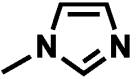


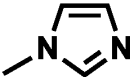
[43] Na tabela 2 aborda-se todos os possíveis substituintes (R1, R2, Z, Z' e M) para as combinações MPn-PSm explicitadas na Tabela 1:

Tabela 2 - Combinações MPn-PSm com as possíveis substituições R1, R2, Z, Z' e M.

Ref.	Var.	R1	R2	Z	Z'	M
MP1-PS1 ou MP2-PS1	I	-	-	H ou C _n H _{2n+1} CO-C _n H _{2n+1} 1<n<12	H ou C _n H _{2n+1} 1<n<12	-
MP1-PS2 ou MP2-PS1	II			-	-	H ou Zn ou Al

						ou Pd
		A = F ou Cl; A' = H ou F ou Cl; B = B'=H; Y = OH, SH, N-				
MP1-PS2 ou MP2-PS1	III			-	-	H ou Zn ou Al ou Pd
		A= F ou Cl; A' = H ou F ou Cl; B= F ou Cl; B' = H ou F ou Cl; Y= OH, SH, N-				
MP1-PS2 ou MP2-PS1	IV			-	-	H ou Zn ou Al ou Pd
		A = F ou Cl; A' = H ou F ou Cl; B = H ou F ou Cl; C = H ou F ou Cl; Y = OH, SH, N-				
MP1-PS2 ou MP2-PS1	V		H	-	-	H ou Zn ou

						Al ou Pd
		A = F ou Cl; A' = H ou F ou Cl; B = B'=H; Y = OH, SH, N-				
MP1-PS2 ou MP2-PS1	VI		H	-	-	H ou Zn ou Al ou Pd
		A= F ou Cl; A' = H ou F ou Cl; B= F ou Cl; B' = H ou F ou Cl; Y= OH, SH, N-				
MP1-PS2 ou MP2-PS1	VII		H	-	-	H ou Zn ou Al ou Pd
		A = F ou Cl; A' = H ou F ou Cl; B = H ou F ou Cl; C = H ou F ou Cl; Y = OH, SH, N-				
MP1-PS3 ou MP2-PS3	VIII			-	-	H ou Zn ou Al ou

						Pd
MP1-PS3	IX	H		-	-	H
ou						ou
						Zn
MP2-PS3						ou
						Al
						ou
						Pd

Processo de preparação dos produtos poliméricos funcionalizados com fotossensibilizadores (PS) do tipo MPn-PSm

[44] Todos os PSs (PS1, PS2, PS3) utilizados na presente invenção incorporam na sua estrutura nucleófilos (OH, N- ou SH), com características químicas específicas, permitindo desenvolver um processo simples e eficiente de efetuar uma ligação covalente com os materiais poliméricos (MP1 e MP2), contendo na sua estrutura grupos abandonadores do tipo halogênio, através de uma reação de substituição nucleofílica, seguindo as seguintes etapas:

[45] Dissolução do fotossensibilizador (PS) selecionado a partir da família PS1, PS2 ou PS3 com uma base orgânica (tretilamina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]und-7-eno (DBU), 1,5 diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN) ou piridina) ou preferencialmente inorgânica (CaCO_3 , CeCO_3 , NaOH, KOH, $\text{Ba}(\text{OH})_2$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{Be}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$) em um solvente do tipo dimetilformamida (DMF), dimetoxietanoa (DME), tetra-hidrofurano (THF) e derivados, dimetilpirrolidona, diclorometano, acetato de etila ou preferencialmente dimetilsulfóxido (DMSO) para formar a solução designada

doravante por Sol A;

[46] Fazer a imersão do material polimérico MP1 ou MP2 na solução Sol A e deixar a uma temperatura compreendida entre 0°C e 40 °C durante 0,5 a 48 horas, preferencialmente na ausência de oxigênio. Em seguida, retirar o material polimérico ligado covalentemente ao fotossensibilizador (PS) pretendido (MPn-PSm) da solução SolA e lavar de uma a dez vezes com um solvente orgânico, preferencialmente com DMSO, e em seguida com um solvente orgânico de menor ponto de ebulição, preferencialmente etanol.

[47] Secagem do MPn-PSm, preferencialmente à temperatura ambiente, sob vácuo e armazenar na presença ou preferencialmente na ausência de oxigênio e de luz.

[48] Os produtos poliméricos funcionalizados preparados na presente invenção, doravante designados por MP1-PS1, MP1-PS2 (Fórmulas II a VII), MP1-PS3 (VIII e IX), MP2-PS1, MP2-PS2 (Fórmulas II a VII) e MP2-PS3(VIII e IX) foram caracterizados por espectroscopia de transmitância difusa Cary 5000 UV-Vis confirmando-se a ligação do fotossensibilizador (PS) ao material polimérico pela presença no material polimérico de uma banda de absorção típica de cada fotossensibilizador (PS), conforme Figura 2 do exemplo de concretização.

[49] Os materiais poliméricos funcionalizados preparados na presente invenção do tipo MP1-PS1; MP1-PS2; MP1-PS3; MP2-PS1; MP2-PS2 e MP2-PS3 foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho em um aparelho FTIR Nicolet 5700 (ThermoElectron Corporation) espectrômetro equipado com uma Smart Orbit accessory) observando-se as bandas vibracionais típicas do polímero e dos grupos funcionais

específicos de cada fotossensibilizador (PS) ligado ao polímero, conforme Figura 3.

[50] Os materiais poliméricos funcionalizados preparados na presente invenção do tipo MP1-PS1; MP1-PS2; MP1-PS3; MP2-PS1; MP2-PS2 e MP2-PS3 foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) operando com feixe de elétrons de 15kV, corrente de 2,82A e I probe de 200pA. As amostras foram recobertas com 6nm de ouro e mantidas em dessecador até o momento de análise. O resultado da análise revelou a presença do fotossensibilizador (PS) na superfície polimérica (Figura 4).

[51] Os materiais poliméricos funcionalizados preparados na presente invenção do tipo MP1-PS1; MP1-PS2; MP1-PS3; MP2-PS1; MP2-PS2 e MP2-PS3 foram caracterizados por espectroscopia de fluorescência obtida no exterior do tubo. Na figura 5 observa-se na superfície externa do material MP1-PS1 a emissão de fluorescência a 550nm típica da curcumina.

Inativação do crescimento de biofilmes pelos materiais poliméricos MPn-PSm

[52] Os produtos poliméricos funcionalizados com os sensibilizadores preparados na presente invenção do tipo MP1-PS1, MP1-PS2, MP1-PS3, MP2-PS1, MP2-PS2 e MP2-PS3 inativaram o crescimento de biofilmes de bactérias do tipo gram-positiva em particular, em bactérias *S. aureus* (Figura 6), ou gram-negativas em particular, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* no escuro, ou preferencialmente na presença de um dispositivo que emite luz de comprimento de onda apropriado, nomeadamente na região do visível (370 a 700 nm) ou do infravermelho próximo (700 a 850nm). Os micro-organismos

formadores de biofilmes foram incubados em suspensão com os materiais poliméricos (MP1 ou MP2) ligados covalentemente com o fotossensibilizador (PS) selecionado do tipo PS1, PS2, PS3 (materiais MPn-PSm) durante 24 horas, e em seguida expostos à luz do dispositivo que emite luz de comprimento de onda apropriado. Para determinar a eficiência da inativação fotodinâmica, foi utilizado o método de recuperação de células por unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Os resultados revelaram que os materiais poliméricos MPn-PSm foram eficientes na diminuição da aderência e inativação do crescimento de biofilmes microbianos, na ausência ou preferencialmente com irradiação com luz de comprimento de onda adequado para cada fotossensibilizador (PS). Na figura 6 do exemplo 1 observa-se a inativação microbiana no escuro (56%) e a inativação microbiana após irradiação com luz de comprimento de onda de 450 nm (98%). O exemplo demonstra que os materiais MPn-PSm promovem a inativação de biofilmes no escuro e com elevada eficiência por ação fotodinâmica.

Exemplo 1: Processo de preparação do material polimérico MP1-PS1 através da ligação covalente da curcumina (PS1) a um tubo endotraqueal (TE) constituído por PVC (MP1)

[53] Preparação da solução designada por SolA na presente invenção: dissolver curcumina (396 mg; 1,07 mmol) e Cs_2CO_3 (1,99 g; 6,01 mmol) em dimetilsulfóxido (DMSO; 80 mL).

[54] Pesagem do tubo endotraqueal (TE) (11 g) constituído pelo material polimérico MP1 e submersão na SolA, à temperatura de 30°C a 40°C, durante 4 a 8 horas, sob atmosfera de nitrogênio ou argônio;

[55] Retirada do TE funcionalizado, constituído por MP1-PS1, da solução, lavagem inicial com DMSO (quatro vezes, 20 mL) e finalmente com etanol (4 a 10 vezes, 20 mL), até não se observar curcumina por UV-Vis.

[56] Secagem do TE funcionalizado (MP1-PS1) preferencialmente à temperatura ambiente, sob vácuo, de 1 a 3 dias.

[57] Armazenagem à temperatura ambiente, na ausência de oxigênio e de luz.

[58] A caracterização do tubo TE funcionalizado com curcumina (PS1) designado por material MP1-PS1, foi efetuada pelas diversas técnicas:

[59] UV-Vis: Na Figura 2 identifica-se o espectro de absorção UV-vis do tubo endotraqueal funcionalizado com curcumina (Figura 2, curva verde) que mostra uma banda a 430 nm, típica do espectro de absorção da curcumina não imobilizada, em solução de etanol (Figura 2, curva azul), e o tubo endotraqueal (TE) (Figura 2, curva preta) que não possui nenhuma absorção nesta região.

[60] FTIR: Na Figura 3 a ligação da curcumina no tubo endotraqueal (TE) foi confirmada pela análise de infravermelho do tubo funcionalizado com curcumina (MP1-PS1, curva azul), em comparação com o tubo endotraqueal (TE, curva preta) e a curcumina (PS1, curva vermelha). O espectro da curcumina mostrou seus picos característicos em 3509 cm^{-1} (grupo hidroxila -OH), $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ (C=O), 1509 cm^{-1} (C=C etileno), 1250 cm^{-1} (C-O-C grupo éter). O espectro do tubo endotraqueal funcionalizado com curcumina (MP1-PS1, curva azul) em comparação com o espectro da curcumina não imobilizada (PS1) e do tubo endotraqueal (TE) apresenta picos

de: 3506 cm^{-1} (grupo hidroxila -OH), $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ (C=O), 1512 cm^{-1} (C=C etileno) corroborando a presença da curcumina ligada covalentemente ao tubo endotraqueal (TE).

[61] MEV: A ligação da curcumina ao tubo endotraqueal (TE) também foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tubo endotraqueal (TE) (Figura 4, a) e tubo endotraqueal funcionalizado com curcumina (MP1-PS1) (Figura 4, b), cuja presença de curcumina na superfície do tubo endotraqueal (Figura 4, b) foi evidenciada.

Estabilidade do tubo TE funcionalizado com curcumina (PS1) designado por material MP1-PS1

[62] A estabilidade do tubo endotraqueal funcionalizado com curcumina (MP1-PS1) foi confirmada através de uma análise do espectro de absorção UV-vis ao longo do tempo em diferentes pHs (2,7,10), mimetizando o sistema biológico. (Figura 7 a-c). Não se observou a liberação da curcumina do tubo endotraqueal em nenhum dos pHs avaliados.

Microbiologia do tubo com curcumina

[63] O micro-organismo utilizado foi *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925). O inóculo foi preparado em tubos Falcon de 15 mL contendo meio de cultura de crescimento Brain Heart Infusion (BHI) e inóculo bacteriano, em proporção 9:1. O tempo de incubação do pré-inóculo foi de 15 horas em uma estufa rotativa a 37°C a 140 rpm. Para a formação do biofilme foi realizado as seguintes etapas:

- Os micro-organismos do pré-inóculo foram separados do meio de cultura por centrifugação (15 min. a 1500 rpm);
- Foram realizadas duas sucessivas lavagens com o tampão fosfato "Phosphate Buffered Saline" (PBS) por centrifugação (15 min. a 1500 rpm);

- Os tubos endotraqueais estéreis foram cortados em pedaços de um centímetro de comprimento dentro de um ambiente estéril (Fluxo laminar, Airstream, Esco Class II bsc).

- Cada pedaço do tubo endotraqueal cortado anteriormente foi inserido em cada poço das placas de 24 poços.

- Junto aos poços, contendo os tubos cortados, adicionou-se 900 µL do meio de cultura líquido e 100 µL do inóculo bacteriano.

- A solução foi homogeneizada 6 vezes com uma pipeta de 1000 µL em cada poço da placa;

- Os biofilmes formados foram caracterizados por contagem de colônias bacterianas (UFC/mL).

[64] A iluminação dos experimentos foi realizada com uma fonte de luz composta por LEDs desenvolvida pelo Laboratório de Apoio Tecnológico - LAT/USP (Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP). A fonte de luz utilizada nos experimentos de irradiação do MP1-PS1 emite radiação em 450 nm e é projetada para uma irradiação uniforme e contínua em placa de 24 poços, com irradiação de 70 mW/cm² durante 12 minutos. A medida de irradiação foi feita com auxílio de um potenciômetro, com coletor de raio igual a 0,4 cm, totalizando uma área de 0,5 cm². Para o cálculo da irradiação em cm² é usada a equação:

$$I=P/A;$$

Onde I= Irradiação do Potenciômetro; P= Potência medida pelo potenciômetro e A= área do potenciômetro.

[65] Para o cálculo do tempo necessário de iluminação para alcançar a dose de energia necessária segue a seguinte equação:

$$T=D/I;$$

Na equação, T= tempo de iluminação, D= dose desejada de energia e I é a irradiação calculada do LED.

[66] Durante as iluminações as amostras foram protegidas com papel alumínio para evitar qualquer influência externa que possa vir a ocorrer.

[67] A contagem das colônias bacterianas contidas nas placas de Petri com meio de cultura BHI sólido para observação macroscópica das bactérias foram realizadas após incubação das amostras por 24 horas a 37°C. Cada grupo experimental foi feito em triplicata e as colônias entre 3 a 30 foram contadas. A média de cada grupo foi calculada em UFC/mL de acordo com a seguinte equação:

$$UFC/mL = (n^{\circ} \text{ de colônias} \times n^{\circ} \text{ de diluições}) / \text{Volume};$$

O n° de colônias é a média obtida pela contagem das colônias das placas dos grupos experimentais realizados em triplicata.

[68] Depois de remover as células planctônicas lavando todos os tubos com PBS, estes foram separados em quatro grupos experimentais: biofilmes formados na superfície do tubo endotraqueal (TE); biofilmes formados na superfície dos tubos funcionalizados com curcumina (MP1-PS1); biofilmes formados na superfície do TE irradiado sob dose de luz de 50J/cm²; biofilmes formados na superfície dos tubos MP1-PS1 irradiado sob dose de luz de 50J/cm². Os biofilmes bacterianos foram removidos da superfície do tubo com PBS por meio de agitação mecânica e realizado o método de plaqueamento em Ágar sólido de contagem de colônias bacterianas para avaliação antimicrobiológica dos grupos.

[69] Assim, o presente exemplo refere-se à preparação do tubo endotraqueal (TE) funcionalizado com curcumina

designado por material MP1-PS1, para aplicações em pacientes que necessitam de ventilação mecânica e estão normalmente acamados em leitos hospitalares, com ou sem associação com terapia fotodinâmica (TFD) para inativação de micro-organismos e dificultar a formação de biofilmes microbianos.

[70] Em uma modalidade preferida da presente invenção, o referido tubo endotraqueal (TE) funcionalizado com curcumina designado por material MP1-PS1 obtido possui a capacidade de diminuir a aderência e proceder à inativação de micro-organismos, mediante o uso associado à aplicação de uma fonte de luz em comprimento de onda (450 nm) favorecendo o processo de descontaminação desses cateteres.