



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102013010798-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102013010798-0

(22) Data do Depósito: 02/05/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 13/09/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 36/02; A23K 20/195; A61P 31/04.

(66) Prioridade Interna: BR102012013028-9 de 30/05/2012.

(54) Título: COMPOSIÇÃO VETERINÁRIA PARA TRATAR OU PREVENIR INFECÇÕES BACTERIANAS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, -. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua João Negrão, 280, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: MIGUEL DANIEL NOSEDA; TATIANE WINKLER MARQUES MACHADO; MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA; JENIFER MOTTA RODRIGUES.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 02/05/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 16/03/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



COMPOSIÇÃO VETERINÁRIA PARA TRATAR OU PREVENIR INFECÇÕES BACTERIANAS

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção refere-se a uma composição veterinária para tratar ou prevenir infecções bacterianas que compreende extrato de microalgas, contendo proteínas e polissacarídeos. Mais especificamente trata da utilização de extratos de microalgas de *Pavlova* sp. para preparação de uma composição alimentícia veterinária para tratar ou prevenir infecções bacterianas causadas por bactérias patogênicas gram-negativas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

Microalgas

[2] As microalgas são microorganismos capazes de desenvolver-se tanto em água doce quanto no ambiente marinho, onde constituem o fitoplâncton e são responsáveis por grande parte da atividade fotossintética, absorvendo CO₂ e liberando O₂ e água (DERNER *et al.*, 2006). Alguns desses organismos são submetidos a condições extremas em seus habitats naturais, por isso, tornaram-se capazes de adaptar-se rapidamente às condições do ambiente para sobreviver, produzindo uma grande variedade de metabólitos secundários, biologicamente ativos, os quais não são encontrados em outros organismos (PLAZA *et al.*, 2008). Deve-se levar em conta o grande número de espécies, facilidade de cultivo, crescimento rápido, e a possibilidade de controlar a produção de alguns compostos bioativos pela manipulação das condições de cultivo. Por essas razões as algas

em geral, são consideradas por alguns pesquisadores uma boa alternativa aos compostos químicos sintéticos (PLAZA *et al.*, 2008).

[3] Microalgas têm recebido maior atenção nos últimos anos devido ao seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, carotenoides e outros pigmentos (com ação antioxidante), esteróis (com ação antimicrobiana), polissacarídeos sulfatados (com ação antiviral, antitumoral e anti-inflamatória) (MINKOVA *et al.*, 1996; MATSUI *et al.*, 2003; HERRERO *et al.*, 2006; GARDEVA *et al.*, 2009; PLAZA *et al.*, 2010), e polissacarídeos do tipo glucanas (com ação imunoestimulante) (SUÁREZ *et al.*, 2006).

[4] Segundo Spolaore (2005) uma qualidade importante das microalgas é sua composição química, a qual se faz interessante para aplicação na nutrição humana e animal, devido ao alto teor de proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e pigmentos. Pesquisas recentes de Cardozo *et al.* (2006), na área de compostos obtidos de fontes naturais, mostraram que as microalgas são promissoras fontes de compostos biologicamente ativos. Entre os compostos obtidos destacam-se ácidos graxos, carotenoides, polissacarídeos, lectinas, compostos halogenados, entre outros.

[5] Brown *et al.* (1997) analisaram a composição química de cerca de 40 espécies de microalgas de sete classes distintas e observaram variação no teor de proteínas (6-52%), carboidratos (5-23%) e lipídios (7-23%) entre as espécies. Todas apresentaram composição similar de aminoácidos. Além disso, foi observado uma variação na composição dos ácidos graxos entre as classes, e presença de ácido ascórbico e riboflavina em todas as espécies analisadas. Polissacarídeos variaram quanto a sua composição de açúcares, sendo a glucose (21-87%) o monossacarídeo majoritário.

[6] Os carboidratos, um dos principais componentes da biomassa microalgal, estão presentes na parede celular, ou como

material de reserva destas células. Devido à grande heterogeneidade de espécies, a composição dos polissacarídeos das microalgas se diferencia acentuadamente entre espécies e classes (PAINTER, 1983; BROWN, 1991).

[7] Dentre os polissacarídeos de microalgas estudados, a glucose é a principal unidade monossacarídica constituinte, mas são encontradas também ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactose, detectadas em diferentes proporções (PAINTER, 1983; BROWN, 1991; BROWN *et al.*, 1997). A composição do carboidrato, especialmente seu conteúdo de glucose, pode variar de acordo com fatores ambientais e o período de crescimento (RIJSSEL *et al.*, 2000).

[8] A substância de reserva comumente descrita para a família Pavlovophyceae, a qual pertencem os organismos tratados neste documento, são glucanas β -(1→3) ligadas (LOURENÇO, 2006), ou ainda glucanas β -(1→3) ligadas com substituições em O-6 (REVIERS, 2006). Não foram encontrados na literatura dados específicos sobre os polissacarídeos de *Pavlova lutheri* e *P. gyrans* nem das outras espécies pertencentes à família Pavlovophyceae – dos gêneros *Diacronema* e *Exanthemachrysis*.

[9] Machado (2011) isolou da microalga *Pavlova lutheri*, no extrato aquoso, uma glucana β -(1→3)(1→6)-ligada com diferentes graus de ramificação, além de uma β -xilana (1→4)-ligada, presente no extrato alcalino, possivelmente constituinte da parede celular.

Potencial biotecnológico de compostos extraídos de microalgas

[10] O potencial biotecnológico da biomassa de microalgas tem sido explorado apenas recentemente, quando se percebeu a ampla gama de produtos, tais como suplementos alimentares, produtos químicos industriais, compostos com aplicações terapêuticas, entre

outros, que podem se originar a partir da biomassa ou da extração de compostos (OLAIZOLA, 2003).

[11] Li et al. (2005) isolou o pigmento proteico ficocianina da microalga *Spirulina platensis*. Este pigmento foi capaz de aumentar a expressão de proteínas apoptóticas em células tumorais como decorrência do aumento de sua concentração. Foi observado também que esse aumento da concentração melhorou a atividade de captação de radicais livres (ESTRADA et al., 2001).

[12] Rodriguez-Garcia e Guerrero (2007) estudaram o extrato etanólico de três espécies de microalgas *Porphyridium cruentum*, *Porphyridium tricornutum* e *Chlorella vulgaris*, e tais espécies apresentam-se como importantes fontes de compostos antioxidantes naturais em alternativa aos sintetizados quimicamente ou extraídos de plantas superiores. A microalga *Haematococcus pluvialis* também é conhecida por seu alto teor do carotenoide astaxantina, muito utilizado como corante na alimentação de peixes e aves, além de ter conhecida atividade antioxidante (JAIME et al., 2009).

[13] O documento de invenção US 2010/0239712 trata da inclusão da biomassa de algas e do óleo de algas na composição de alimentos, combinadas com um ou mais ingredientes. Os componentes das microalgas ou a própria biomassa microalgal é derivada de culturas heterotróficas, contendo pelo menos 10% de óleo por peso seco da biomassa.

[14] Devido ao alto teor de lipídios encontrados nestes microorganismos marinhos, 1 a 70%, podendo alcançar até 90% em alguns sob certas condições (SPOLAORE, 2005), principalmente ácidos graxos de cadeia longa como ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) (TONON et al. 2002), muitas das invenções relacionadas a microalgas tratam do potencial biotecnológico e métodos para extração de lipídios microalgais.

[15] O documento de invenção US 2011/0251278 relata a extração de um extrato de microalgas bifásico, compreendendo 15-95% do peso seco, sendo que desses, pelo menos 1% é composto de ácidos graxos de cadeia insaturada do tipo ômega 3, como DHA e EPA. Enquanto a patente US 2012/0238732 trata de um método para extração de óleos e recuperação da biomassa de microalgas.

[16] O documento de invenção US 2009/0274736 relata o método de cultivo das microalgas do gênero *Porphyridium*, para produção de polissacarídeos e uma composição dos mesmos. São descritas, ainda a utilização destes polissacarídeos como redutores de colesterol em mamíferos, inativadores de vírus, estabilizantes em alimentos e outros usos.

[17] É objeto de invenção US 2011/0117059 uma a composição de fibras solúveis indigeríveis e pelo menos um tipo de microalga, que apresentem efeito sinérgico na indução do crescimento da flora intestinal de animais onívoros e carnívoros. Nesse documento é demonstrado o efeito sinérgico de fibras (polissacarídeos), como maltodextrina e polidextrose, com a parede celular de organismos eucarióticos, como as microalgas. Acredita-se que esse efeito ocorra devido à indução da flora intestinal pela ingestão da mistura, a qual consequentemente libera enzimas capazes de degradar a parede celular das microalgas, liberando vários compostos capazes de promover o crescimento de outras bactérias benéficas da flora intestinal.

[18] Os polissacarídeos de microalgas dos gêneros *Parachlorella* e *Chlorella* foram objeto de invenção da patente US 2012/0202768, onde é apresentada a composição de açúcares dos exopolissacarídeos isolados das mesmas, além de métodos para aplicação de polissacarídeos em cosméticos e produtos para melhora da aparência da pele de forma geral.

[19] US 2011/0104189 descreve a composição dos polissacarídeos obtidos a partir de microalgas do gênero *Chlorella*, e prevê um método de modulação da resposta imune pela administração desses polissacarídeos, podendo ser utilizado como um método de tratamento para infecções bacterianas ou sua prevenção sob forma de vacina. Outras atividades biológicas de polissacarídeos extraídos de *Chlorella* têm sido descritas como efeitos imunomodulatórios (SUAREZ et al., 2006) e antitumoral (SHENG et al., 2007).

[20] US 2011/0070159 trata da invenção de uma mistura de polissacarídeos extraídos de microalgas vermelhas com metais, para diversos tipos de formulações farmacêuticas, principalmente de uso tópico. Isso é decorrente da sua estabilidade, capacidade de formação de gel, a difícil degradação e atoxicidade, além de apresentarem propriedades antimicrobianas e antivirais. No documento US 2009/0017058 os polissacarídeos obtidos do gênero *Porphyridium*, são utilizados na preparação de um lubrificante de articulações para o tratamento de artrite. A patente US 2007/0166797 relata a atividade dos polissacarídeos de microalgas do gênero *Porphyridium* como antivirais. Diversos autores publicaram os efeitos antivirais contra os vírus Herpes simplex, Varicella zoster (in vitro e in vivo) e retrovírus (in vitro) (HULEIHEL et al., 2001; HULEIHEL, et al., 2002; TALYSHINSKY et al., 2002), antitumoral (GARDEVAL et al., 2009) e hipocolesterolêmico (DVIR et al., 2000) de polissacarídeos extraídos de microalgas vermelhas.

[21] Com relação aos polissacarídeos obtidos de microalgas do gênero *Pavlova*, nenhum documento de invenção foi encontrado até o momento. Documento, como o EP 2011/0160790, que apresenta inovações diretamente relacionadas às espécies que são utilizadas nesse trabalho trata de composições e métodos para recuperação de lipídios e podem ser utilizados em diversas espécies de microalgas. Além

disso, o documento KR 2008/0010567 relata a adição de 1,6-anidro-D-glucose no meio de cultura de diversas microalgas, incluindo *Pavlova lutheri*, para melhorar o crescimento das mesmas.

[22] Com relação às glucanas, polissacarídeos presentes nas microalgas do gênero *Pavlova*, existem várias aplicações descritas, entretanto trata-se de glucanas de outras fontes comuns que não microalgas, entre elas destacam-se fungos e cereais. É importante ressaltar que as microalgas são de fácil cultivo e baixo custo de produção. Podem ser cultivadas em larga escala para obtenção de compostos de interesse comercial.

Atividades descritas para glucanas

[23] Mantovani et al. (2008) revisaram as atividades promotoras de saúde destas moléculas e destacam que as potenciais fontes de β -glucanas têm um grande interesse econômico. Devido à atividade imunoestimuladora, essas moléculas podem auxiliar no combate a infecções por vírus, bactérias, fungos e parasitas. Além de exibirem propriedades hipocolesterolêmicas, anticoagulantes e antitumorogênicas.

[24] As glucanas são muito conhecidas por suas atividades imunomoduladoras. Bao et al. (2001) e Bao et al. (2006) demonstraram a atividade imunomoduladora de uma glucana complexa, extraídas do fungo *Ganoderma lucidum*, com cadeia principal 1→3 ligada, substituída em O-6 por cadeias laterais de glucose 1→3,6 ligadas. Atividades imunomoduladoras de β -glucanas extraídas de fungos também foram relatadas por Silva et al. (2006).

[25] O documento de invenção CN 102357105 relata o uso de glucanas em misturas, as quais podem ser empregadas em alimentos ou produtos medicinais com objetivo de aumentar a imunidade.

[26] O documento JP 3133934 relata uma β -glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas, com ramificações em C6, extraída do fungo *Polyporus confluens* que apresenta atividade antitumoral. A glucana β -(1 $\rightarrow$ 3)-ligada obtida do cogumelo *Grifola frondosa* foi submetida a um tratamento de fosforilação e apresentou atividade antiviral contra o Vírus da imunodeficiência Humana (HIV) (JP 9316104).

[27] O documento de patente JP 2010/285421 descreve a utilização de glucanas β (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas juntamente com *Lactobacillus* como imunoativador intestinal, aumentando a produção de imunoglobulinas A, prevenindo doenças infecciosas e diminuindo riscos para a saúde. Na área de imunoativação intestinal o documento JP 2006/137719 desenvolve uma nova aplicação para β -glucanas, como indutor de proliferação de linfócitos, citocinas e imunoglobulinas, atuando como agente na prevenção de doenças infecciosas.

[28] O documento de invenção BR PI0402473-7 trata da utilização de glucanas obtidas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, com tamanho em torno de 6500 Daltons e unidades de glucose ligadas em C-3 de forma linear, para o combate a doenças infecciosas recidivas, de origem fúngica, bacteriana, viral ou protozoótica. Essa atividade deve-se principalmente a atividade do sistema fagocítico monocitário induzido pelas glucanas.

[29] A composição de um alimento destinado a prevenção de doenças infecciosas, contendo uma glucana oriunda de parede celular de leveduras da indústria cervejeira e betaina, é descrita no documento JP 2001/008636. Tal produto é útil para saúde de humanos e na redução da mortalidade de animais como aves, gado e peixes. A formulação é preparada de forma que seja administrada uma quantidade de 0,5 a 0,8 g/Kg de peso do animal. O documento KR 2002/0094269, relata a composição de ração para peixes com adição de β -glucanas com finalidade de aumentar a taxa de crescimento de

peixes e reduzir a mortalidade decorrente de infecções por bactérias patogênicas devido ao aumento da imunidade. A composição contém 0,01 a 0,1% p/p de β -glucana. O documento CN 101715877 relata a utilização de parede celular de levedura, a qual contém β -glucanas, em composições com bactérias probióticas. A glucana liberada da parede é responsável por aumentar a imunidade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo considerado um método simples para aumentar a performance e ganho de peso em animais de criação.

[30] A patente JP 60045522 trata da utilização da β -glucana-(1 $\rightarrow$ 3)-ligada extraída do cogumelo *Lentinus edodes*, no tratamento de doenças causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, tal pode ser aplicado em humanos ou animais, via oral ou parenteral, numa dose de 1-2 mg/dia.

[31] O documento de invenção US 2012/0202770 descreve a utilização de mananas e/ou glucanas, preferencialmente ambas, na composição de ração ou aditivos para ração animal que atuem como promotores de crescimento em animais, bovinos, suínos, aves, mas principalmente peixes. A fonte destes polissacarídeos é diversa, porém destacam-se os obtidos a partir da parede celular de leveduras, onde encontram-se os manooligosacarídeos que previnem a ligação de lectinas das bactérias em receptores de células intestinais, e as glucanas, que são ativos imunoestimulantes.

[32] A β -glucana extraída da parede celular de leveduras foi objeto de invenção no documento KR 2003/0087383 sendo utilizado como um método de tratamento no controle de colesterol, arteriosclerose, hipertensão, diarreia, constipação.

Infecções entéricas e seu controle

[33] As infecções entéricas são um grande problema de saúde pública em todo o mundo, visto que são uma das maiores causas de mortalidade, cerca de dois milhões mortes/ano (WILSON *et al.*, 2002; PATON *et al.*, 2006; RASKO e SPERANDIO, 2010; GANNER *et al.*, 2010). Tais infecções são causadas por bactérias gram-negativas. Entre elas cita-se principalmente os gêneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Helicobacter*. Existe uma grande necessidade por parte das indústrias de alimentos/rações e da medicina humana e animal em criar métodos de defesa contra doenças causadas por essas enterobactérias.

[34] As doenças entéricas, entre elas a salmonelose, ocorrem principalmente decorrentes da ingestão de alimentos contaminados, fazendo parte, portanto, do grupo de doenças transmitidas por alimentos. Os principais alimentos responsáveis pela transmissão de doenças gastrointestinais são aves, carne suína e bovina.

[35] De acordo com dados epidemiológicos da Secretária de Vigilância em Saúde, de 2000 a 2011 houve 1660 surtos de salmonelose no Brasil (SVS, 2011), o que representa um grande gasto governamental em saúde pública para a contenção e o tratamento destas infecções. Visto isso, as indústrias farmacêuticas e de alimentos têm buscado novas alternativas para prevenção e tratamento dessas doenças, de forma a diminuir o ônus aos cofres públicos e promover a saúde de animais e humanos (GANNER *et al.*, 2010). Ao implantar medidas profiláticas contra infecções gastrointestinais em animais, o risco de transmissão pela cadeia alimentar será reduzido.

[36] Devido a administração prolongada de antibióticos em animais criados para abate, com a finalidade de promover a saúde e diminuir a infecção nos animais, as bactérias estão tornando-se resistentes a este tratamento (PATON *et al.*, 2006; BOROWSKY, 2009; GANNER, 2011; FERKET, 2011; SHARON e OFEK, 2000; SPRING e PRIVULESCU, 2012; HAJATI e REZAEI, 2010; GANNER, 2011). Como

consequência intensificaram-se as pesquisas que procuram alternativas ao uso de antibióticos, através do uso de probióticos, prebióticos, oligo e polissacarídeos (BIGGS *et al.*, 2007; MORAN, 2011; GANNER, 2011).

[37] A ingestão de alimentos contaminados dá início ao processo de infecção pela bactéria, onde a colonização, primeira etapa, é determinante, e consiste na adesão da bactéria a superfície do epitélio intestinal. A colonização é mediada por adesinas (OFEK *et al.*, 1977; LINDHORST *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 2002; OFEK *et al.*, 2003; MORAN, 2011). Após a colonização no hospedeiro, as bactérias invadem o tecido e multiplicam-se, podendo levar o hospedeiro a desenvolver a doença. Por esta razão o alvo das novas pesquisas está na busca por agentes anti-adesão que irão atuar na inibição da ligação entre a bactéria e o tecido do hospedeiro.

[38] As adesinas são proteínas ou carboidratos presentes nas bactérias e um dos principais fatores de virulência, uma vez que são responsáveis pela adesão às células e início da patogênese. Essas estruturas interagem com receptores no tecido de três formas principais: 1) lectinas-carboidratos: envolve a ligação de proteínas (lectinas) que reconhecem especificamente carboidratos, e estão presentes na superfície das bactérias patogênicas, mais especificamente nas fímbrias; 2) proteínas-proteínas: envolve o reconhecimento entre proteínas bacterianas e proteínas complementares localizadas na superfície da mucosa e 3) hidrofobinas-proteínas: caracterizado pela interação entre proteínas e lipídeos (OFEK *et al.*, 2003; LINDHORST *et al.*, 1998).

[39] Bactérias gram-negativas apresentam interações do tipo lectinas-carboidratos. As lectinas estão localizadas nas fímbrias - longos filamentos proteicos que se projetam da superfície da bactéria - e são capazes de reconhecer e ligar carboidratos complementares presentes em receptores do epitélio intestinal do hospedeiro. Essa interação é

fundamental no desenvolvimento do processo-doença e por isso tem sido amplamente estudada (LINDHORST *et al.*, 1998; OFEK *et al.*, 2003; MORAN, 2011).

[40] As alternativas comerciais em uso atualmente produzidas a partir da parede celular de levedura, consistem numa mistura de β -glucanas e manoproteínas (SPEARMAN, 2004; KLIS *et al.*, 2006; KOGAN e KOCHER, 2007), estas moléculas têm sido descritas pela sua capacidade imunomoduladora e de adsorção bacteriana, respectivamente. A capacidade dos manooligossacarídeos em aumentar a resistência do animal à infecções entéricas é dada, então, pelo bloqueio da adesão bacteriana, inibindo assim a colonização por bactérias entéricas patogênicas, além de aumentar a imunidade do animal (BOHN e BeMILLER, 1995; KOGAN e KOCHER, 2007; BUSSIERE, 2010; OFEK *et al.*, 2003; MORAN, 2011; FERKET, 2011; SPRING e PRIVULESCU, 2012).

[41] Pesquisas com novas fontes de agentes capazes de inibir a adesão bacteriana têm sido realizadas. GUZMAN-MURILLO e ASCENCIO, 2000 relataram que polissacarídeos sulfatados de microalgas foram capazes de inibir a adesão da bactéria *Helicobacter pilori*; extratos da parede celular de *Trichosporon mycotoxinivorans* foram capazes de adsorver enterobactérias *in vitro* como demonstrado por GANNER *et al.*, 2010; cepas de *Lactobacillus* mostraram-se eficazes na inibição da aderência de bactérias enteropatogênicas (NEESER *et al.*, 2000; NAKAZATO *et al.*, 2011). Além disso, compostos obtidos de alimentos como cenoura, café, manga e soja (BECKER *et al.*, 2007; BECKER e GALLETTI, 2008) também demonstraram tal atividade.

[42] Visto que a etapa de adesão ao tecido do hospedeiro é crucial para a instalação da infecção, esse tem sido o alvo no desenvolvimento de muitas das estratégias antibacterianas. Agentes que impeçam a ligação de adesinas à receptores nas células gastrointestinais são adicionados a ração animal, o que diminui a

mortalidade e reduz o risco de infecção em humanos pela ingestão da carne contaminadas (BECKER, 2005; BECKER *et al.*, 2007; GANNER, 2011; GANNER *et al.*, 2010).

[43] Grande parte dos agentes utilizados em ração animal atualmente são ricos em manose (MOLIST *et al.*, 2011), um açúcar componente de polissacarídeos, ao qual se atribui a capacidade de adsorver as enterobactérias. Ainda não é totalmente conhecido o mecanismo pelo qual tais moléculas são capazes de impedir o processo de adesão (SPRING e PRIVULESCU, 2012; HAJATI e REZAEI, 2010). Acredita-se que moléculas contendo manose sejam capazes de se ligar às lectinas presentes na superfície das bactérias, como a *Salmonella* sp., como receptores análogos, visto que esses estarão disponíveis em maior número (OFEK *et al.*, 1977; MORAN, 2011). Uma vez que a bactéria não consegue se aderir ao tecido, ela será eliminada do intestino, juntamente com o restante do conteúdo intestinal, sem causar doença, por um mecanismo conhecido como “*Oligosaccharide Decoy Mechanism*” (FIRON *et al.*, 1987; MORAN, 2011).

[44] O mecanismo mediado por açúcares é bem aceito visto as características destas moléculas. Essas moléculas não são tóxicas, mutagênicas ou bactericidas, não implicando em resistência das bactérias, como os antibióticos (SHARON e OFEK, 2000). Entretanto muita informação a respeito do processo de inibição por açúcares ainda não é clara, tais como fonte de obtenção, concentração de inibição e a estrutura de receptores (BECKER e GALLETTI, 2008).

[45] Terapias baseadas na inibição da adesão bacteriana também podem utilizar adesinas análogas. Essas moléculas têm estruturas muito semelhantes as adesinas presentes nas bactérias. As adesinas análogas se ligaria aos receptores do tecido do hospedeiro, por estarem presentes em alta concentração, competindo com as estruturas das bactérias, impedindo dessa forma a adesão (OFEK *et al.*,

2003). Entretanto, o uso de análogos de adesinas deve ser cuidadoso visto que tais moléculas podem ser tóxicas e imunogênicas (BEACHEY, 1981).

[46] Embora o processo de inibição da adesão por agente anti-adesão pareça promissor, alguns aspectos que comprometem essa terapia devem ser observados. Entre eles, o fato de que as enterobactérias apresentam diversos genes distintos codificadores de diferentes adesinas responsáveis pela adesão durante o processo infeccioso, por esse motivo, pode haver na superfície da bactéria mais de uma adesina envolvida nesses processos, e caso os receptores análogos não apresentem uma estrutura com amplo grau de reconhecimento por diferentes adesinas, esses agentes podem não impedir a adesão. Além disso, podem ocorrer interações múltiplas durante o processo de adesão patogênica, como interações hidrofóbicas ou outras interações não específicas.

[47] Compostos contendo manose, ou derivados deste açúcar estão entre os mais descritos em formulações para o controle de infecções bacterianas, embora existam os mais diversos carboidratos citados com essa propriedade. O uso de carboidratos no tratamento e prevenção dessas doenças infecciosas é relatado em diversos documentos, não apenas para o controle das doenças entéricas, causadas por enterobactérias, mas também para o controle de outras doenças, como infecções urinárias e infecções respiratórias.

[48] Entre os documentos revisados muitas estratégias são descritas, além daquelas que inibem a adesão dos patógenos à mucosa do hospedeiro.

[49] US 6,126,961 relata a redução ou eliminação de bactérias patogênicas do trato intestinal de animais com o uso de uma composição contendo polissacarídeos com açúcares específicos, como ribose ou ramnose, manose, galactose, galactosamina, fucose,

arabinose e derivados. Esses açúcares, segundo o autor, têm estruturas e configurações espaciais que promovem sua adesão aos receptores na superfície dos patógenos e conseqüentemente são eliminados fisicamente do intestino do animal.

[50] US 7,682,631 refere-se a composições contendo nanopartículas com compostos bifuncionais, incluindo glicolipídeos, glicoproteínas, peptídeos, polipeptídeos, lipídeos, monossacarídeos e polissacarídeos, que previnem ou tratam infecções causadas por uma variedade de patógenos. Esses compostos bifuncionais, localizados no centro da nanopartícula, são idênticos aos receptores localizados na superfície de células hospedeiras, podendo ser reconhecidos e ligados pelas adesinas dos patógenos. Isto torna essa composição útil na prevenção de infecções entéricas, dada a possibilidade de que os patógenos sejam eliminados dos animais.

[51] US 2012/0202770 relata uma composição contendo glucanas e mananas para alimentação de peixes. Esta composição promove o ganho de peso desses animais e atua no tratamento de infecções por parasitas, diarreia e doenças intestinais. As mananas são as moléculas ativas no tratamento das infecções, enquanto as glucanas agem como imunomoduladores.

[52] O documento de invenção JP 8173055 relata ração para animais domésticos constituída por polissacarídeos contendo manose, obtidos a partir de diversas fontes como feijão-guar ou a polpa de coco residual da extração de óleo, eficaz na prevenção da contaminação por *Salmonella* sp.

[53] A patente US 5,703,060 descreve um método para prevenção e tratamento de infecções e infestações em animais, pela administração de uma quantidade suficiente de manana acetilada, um polímero de manose, obtido de *Aloe* sp.

[54] O documento WO 2009/144070 trata de uma pré-mistura para alimentação animal, contendo polímero de manose, uma enzima β -mananase e um agente anti-adesão. O polímero de manose deve apresentar entre 10 e 100% desse monossacarídeo, ou seja, um homopolissacarídeo de manose, ou um heteropolissacarídeo contendo manose e outros açúcares. Podem ser fontes desse polímero goma guar, goma arábica, goma xantana, pectinas entre outras, ou a mistura destas. A β -mananase é responsável por inibir a aderência das moléculas que são produto da atividade enzimática. O agente anti-adesão pode ser do grupo dos silicatos. Essa pré mistura, foi testada em aves e se mostrou eficaz na inibição da colonização intestinal por *Salmonella* spp., sem afetar o crescimento dos animais.

[55] Na invenção WO 2011/073112 um derivado do açúcar D-manopiranosose é eficiente como antagonista da adesão bacteriana, podendo ser utilizado na prevenção e tratamento de infecções do trato urinário por *E. coli*.

[56] O uso de carboidratos com diversas estruturas distintas – 1-O- α -D-glucopiranosil-D-sorbitol, 6-O- α -D-glucopiranosil-D-sorbitol, ácido lactobiônico e ácido maltobiônico, frutooligossacarídeos, quitosanoligossacarídeos, oligossacarídeos de galactomananas, hidrolisados de pectina, entre outros – são objeto de invenção do documento WO 02/060452 que relata o uso desses carboidratos no tratamento de infecções bacterianas intestinais em animais. A invenção também trata da inclusão desses carboidratos na dieta animal como aditivo.

[57] Glucoligossacarídeos e oligossacarídeos de isomaltose são tratados na patente WO 03/045401 como um método para aumentar a saúde e a produtividade de animais ruminantes. O método inclui a administração oral para animais, em doses eficazes, destes oligossacarídeos indigeríveis.

[58] A invenção WO 01/65949 trata do uso de oligossacarídeos como frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, inulina, rafinose, entre outros, obtidos de fibra de coco, chicória, farelo de arroz, alfarroba, beterraba ou goma arábica, no tratamento de animais domésticos, como cães e gatos, infectados com enteropatógenos como *Campylobacter*, *Salmonella* e *E.coli*.

[59] O tratamento da diarreia, causada pela infecção por *E. coli* enteropatogênica (EPEC), é objeto de invenção do documento WO 00/51644. Para tal é relatado um método utilizando composições oligossacarídicas. A invenção trata também de um método para reduzir a virulência de EPEC. Outros documentos também referem métodos para prevenir e tratar diarreia, como é o caso da patente WO 97/02829, que relata a redução da duração e recorrência de diarreia com a administração de 0,5 a 5 g frutooligossacarídeos/dia. Estes oligossacarídeos podem ser obtidos por síntese química ou enzimática, isolados de plantas e adicionados em formulações nutricionais como tabletes, iogurtes, produtos fermentados, entre outros. WO 00/54788 refere-se a uma composição de uso médico e veterinário, baseado em bactérias lácticas e carboidratos, com a função de recuperar o equilíbrio da microbiota intestinal e aliviar sintomas como a diarreia.

[60] O uso de oligossacarídeos indigeríveis no documento US 5688777 como inibidor da infecção intestinal por *Clostridium difficile*, é relatado como uma associação à manutenção da microbiota endógena benéfica de mamíferos. Durante a administração de antibióticos ocorre um desbalanço da microbiota, que permite a multiplicação desses patógenos comumente associados à diarreia.

[61] US 5,484,773 trata do uso de composições oligossacarídicas na neutralização de toxinas de *C. difficile*, para o tratamento de diarreia causada pela infecção com estes microrganismos e uso de antibióticos.

[62] O documento US 4,987,124 relata um método e composição para inibição do crescimento de *Salmonella*. A formulação é composta de frutoligossacarídeos, com 1 a 8 resíduos de frutose, fermentáveis por bactérias benéficas da microbiota, as quais produzem metabólitos que inibem o crescimento de *Salmonella*. A composição pode ser incluída na alimentação de animais domésticos.

[63] Carboidratos não digeríveis por enzimas do trato gastrointestinal, derivados de oligossacarídeos, hidrolisados de carboidratos poliméricos ou uma mistura destes, são relatados no documento EP 1698341 devido sua atividade antibactericida e antidiarreica, através de diversos mecanismos de ação frente às bactérias. Entre eles, a prevenção da adesão de bactérias patogênicas ao epitélio intestinal, pelo bloqueio das fímbrias das mesmas e a fermentação por bactérias benéficas que produzem compostos, como ácido butírico, os quais inibem o crescimento de bactérias patogênicas.

[64] US 5,776,524 trata de uma composição para ração animal, contendo 0,2 a 1,5% (p/p) de frutoligossacarídeos, eficaz na redução da quantidade de bactérias prejudiciais ao intestino delgado de animais, como cães, gatos ou cavalos.

[65] É objeto de invenção do documento EP 0171026 um alimento para pecuária que contém principalmente oligossacarídeos, formados por unidades de frutose unidas por ligações do tipo β -(1→2), obtidos a partir de hidrólise parcial da inulina proveniente de *Helianthus tuberosa*. Esse carboidrato pode ser adicionado na alimentação animal numa proporção de 0,1 a 10%, sendo responsável pela diminuição da diarreia frequentemente observada no período de promoção do crescimento.

[66] O documento de invenção WO 98/26662 relata métodos para a síntese de compostos derivados de carboidratos utilizados para tratar e prevenir doenças bacterianas e virais, testados *in vitro*. Os

compostos compreendem oligossacarídeos derivados de glicoproteínas, glicosaminoglicanos e glicolipídeos, ligados a polímeros, mais especificamente, ligados à dendrímeros, inibindo a ligação dos microrganismos patogênicos a seus receptores localizados nas células hospedeiras.

[67] JP 8099884 trata de um hidrolisado de polissacarídeos capaz de suprimir a proliferação de bactérias gram-negativas de mamíferos, aves e produtos animais como ovos. O hidrolisado de polissacarídeos é obtido a partir do tratamento enzimático, com galactomananase ou pectinase, de goma guar, goma de tamarindo, pectinas e goma xantana. A dose diária efetiva relatada no documento é de 0,01 a 10 g/Kg de peso.

[68] O documento de invenção WO 2007/138047 refere-se à utilização de tri ou tetraoligossacarídeos, formados por homo ou hetero, trímeros ou tetrâmeros de pentoses ou hexoses, isômeros D ou L, ou qualquer mistura destes compostos, como agentes aglutinantes de patógenos entéricos. Também é prevista nessa invenção um método para controlar e regular a microbiota gastrointestinal.

[69] O documento US 2002/0019991 trata de uma composição contendo pelo menos um resíduo de fucose α -(1→2)-ligado e seus usos no tratamento e prevenção de infecções entéricas causadas por *E. coli* e *Vibrio cholerae*. A invenção também engloba métodos de screening de composições desse tipo e vacinas para essas infecções.

[70] US 7,893,041 trata de oligossacarídeos específicos ou oligossacarídeos ligados a cadeias de proteínas, e seus métodos de obtenção, que podem ser usadas para tratar ou prevenir infecções causadas por diversos agentes associados a desordens infecciosas, inclusive as entéricas.

[71] A patente WO 03028738 consiste no uso de oligossacarídeos, neutros com cadeia linear ou ramificada, os quais

podem ser adicionados em alimentos, produtos dietéticos e agentes farmacêuticos, e agir na prevenção da invasão e infecção de células de mamíferos por patógenos. Os oligossacarídeos consistem de uma cadeia principal composta por [Gal-HexNAc]-Gal-Glc, unidos entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1→3) ou β -(1→6).

[72] WO 9640169 relata a invenção de um método de tratar infecções respiratórias, causadas pelas bactérias *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Pseudomonas cepacia*, através da administração de quantidade efetiva de inibidor de ligação cuja sua formulação contém oligossacarídeos, que apresentam os seguintes açúcares: galactose, glucose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucose e ácido N-acetilneuramínico.

[73] O documento PT 103983 relata composições contendo um ou dois polissacarídeos sulfatados, obtidos a partir de *Phorphyridium* sp. que apresentaram atividade antiviral e antiadesão bacteriana. Sendo que a inclusão de 20 a 100 $\mu\text{g/mL}$ desses polissacarídeos pode levar a redução da adesão bacteriana em até 50 a 70%.

[74] Visto a revisão apresentada, observa-se que as mais variadas atividades são atribuídas às glucanas, embora seja o seu potencial imunomodulador a atividade mais explorada. Até o momento, não foi encontrada nenhuma publicação ou invenção relacionando as glucanas com atividade inibidora da adesão de bactérias enteropatogênicas a receptores de células intestinais. As invenções que relatam o uso de glucanas, no tratamento de doenças causadas por bactérias infecciosas, tratam do efeito imunomodulador destas moléculas, resultando numa melhora das respostas imunológicas do organismo frente às infecções. A capacidade de adsorção de bactérias enteropatogênicas, como a *Salmonella*, é uma nova aplicação descrita para este tipo de molécula.

[75] As glucanas, comumente relatadas nas invenções, são principalmente obtidas a partir de leveduras e/ou fungos, ou ainda de algumas bactérias, por exemplo, do gênero *Agrobacterium* e *Rhizobium*. Até o momento, não foram encontradas invenções que compreendam glucanas obtidas a partir de microalgas. As microalgas marinhas seriam economicamente interessantes, visto que não necessitam de água potável para seu cultivo. O cultivo é rápido, barato e pode ser realizado em grande escala.

[76] As leveduras são comumente empregadas na fabricação de álcool, bebidas fermentadas e alimentos. Entretanto o processo de obtenção de glucanas a partir da parede celular da parede de leveduras necessita de muitas etapas e, por esse motivo torna-se mais oneroso que os necessários para extração destes polissacarídeos a partir de microalgas.

[77] Com base no exposto, a presente invenção relata uma composição veterinária compreendendo extrato de microalgas compostos por proteínas e polissacarídeos, onde estes últimos são especificamente β -glucanas. A essa composição se atribui o efeito imunomodulador e regulador da microbiota intestinal e inibidor da adesão de bactérias gram-negativas, à receptores da mucosa gastrointestinal por sua possível ligação às adesinas fimbriais.

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

[78] As β -glucanas são polissacarídeos, amplamente utilizados em diversas preparações farmacêuticas ou industriais devido as suas aplicações biotecnológicas. Para obtenção destes polissacarídeos a partir de suas fontes mais comuns como as leveduras, os procedimentos são muito onerosos à indústria, exigem várias etapas e purificação. Em microalgas, o processo de cultivo para obtenção da biomassa, bem

como a extração destes polissacarídeos é bastante simples, rápida e barata.

[79] As doenças causadas por enterobactérias são um grande problema de saúde pública, visto a mortalidade em humanos e animais. A terapêutica associada às doenças entéricas, em geral, é a administração de antibióticos, o que leva ao desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes a estes medicamentos, além de não serem específicos. Neste contexto composições contendo extratos de microalgas compostos por β -glucanas, atuam como agentes atóxicos eficazes no controle da contaminação, funcionando como alternativa aos antibióticos. Podem ser utilizados na base de ponta da cadeia alimentar, atuando como agentes prebióticos ou de controle no tratamento de doenças entéricas causadas por enterobactérias.

[80] Este documento visa, portanto, apresentar uma nova atividade para composições que compreendem estes polissacarídeos de microalgas, como para ser para inibidor da adesão de enterobactérias gram-negativas. Até então não há relatos na literatura desta atividade para composições contendo os componentes destacados na presente invenção.

[81] Os polissacarídeos e proteínas contidos nos extratos de microalgas atuam como receptores análogos, de modo a inibir a patogênese em sua primeira fase – a adesão aos receptores da mucosa do hospedeiro.

[82] A presente invenção trata de uma composição veterinária compreendendo um extrato aquoso e/ou alcalino de microalgas marinhas que consiste em polissacarídeos e proteínas, capazes de mimetizar uma porção do receptor presente nas células. Esses compostos ativos, por estarem presentes em proporção maior em relação aos receptores, competem pelas adesinas das enterobactérias, atuando como um agente adsorvente das mesmas. Assim, a

composição pode ser para tratar ou prevenir doenças gastrointestinais causadas por enterobactérias patogênicas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[83] As matérias primas utilizadas nessa invenção são as microalgas *Pavlova lutheri* (Droop) e *Pavlova gyrams* (Butcher). As etapas do processo para obtenção dos extratos de microalgas utilizados na presente invenção são as mesmas para ambas as espécies. A biomassa das microalgas é obtida após cultivo em água marinha salinidade 30, em biorreatores ou ainda em tanques, em meio de cultura Guillard f/2, com iluminação e aeração constante. As microalgas são isoladas do meio de cultivo através de centrifugação ou floculação e a biomassa seca em liofilizador ou estufa.

[84] Numa primeira etapa a biomassa é ressuspensa em meio aquoso, tamponado ou não, pH entre 5,5–7,5, numa concentração de 10–30 g/L, preferencialmente 15–25 g/L e submetida à extração aquosa, durante 1–4 h a 50–100°C, preferencialmente 100–150 minutos a 75–85°C, sob agitação. Após extração, o sobrenadante é separado da biomassa residual. As macromoléculas (proteínas e polissacarídeos) são precipitadas do sobrenadante através da adição de solvente orgânico polar, por exemplo, etanol, numa concentração de 1–5 volumes. O precipitado é então isolado por centrifugação seguido de secagem/liofilização.

[85] A biomassa residual da extração aquosa é submetida à extração alcalina na concentração de 10–30 g/L, preferencialmente 15–25 g/L com agentes alcalinos, preferencialmente hidróxido de sódio, de molaridade entre 0,2–0,5 M, preferencialmente entre 0,4–0,5 M, pH maior que 9, após adição de NaBH₄ (5% em relação a biomassa - com objetivo de impedir a degradação da molécula, na presença de base, a partir da ponta redutora) por 1–4 h a 50–100°C, preferencialmente

100–150 minutos entre 75–85°C, sob agitação. Após extração o sobrenadante é separado da biomassa e neutralizado com ácidos, preferencialmente ácido clorídrico, até pH entre 6,0–8,0. Em seguida são adicionados 1–3 volumes de solvente orgânico polar. O precipitado formado é então isolado por centrifugação seguido de secagem/liofilização.

[86] Os extratos microalgais obtidos constituem o material com capacidade de adsorver enterobactérias patogênicas.

[87] O extrato aquoso e alcalino então obtidos são compostos de: 5–70% de proteínas e 5–85% de carboidratos.

[88] Análises adicionais do extrato aquoso evidenciaram que esses carboidratos são compostos principalmente por uma cadeia principal de unidades de β -D-glucopirranose unidas por ligações β -(1→3), com 10–90% de ramificações em O-6, por terminais não redutores de glucopirranose, ou ainda pequenas cadeias laterais formadas por unidades de glucose β -(1→6)-ligadas ou β -(1→3)-ligadas.

[89] O extrato alcalino é composto por uma mistura de polissacarídeos, entre eles glucanas β -(1→3)-ligadas, e polissacarídeos constituídos por xilose e manose principalmente.

[90] O extrato bruto apresenta boa capacidade de adsorção de enterobactérias, o que pode ser devido ao efeito sinérgico que ocorre entre as moléculas em uma mistura. Entretanto nada impede que os compostos isolados apresentem atividade igual ou maior que o extrato bruto, podendo ser utilizados para purificação processos físico-químicos como cromatografias, tratamento com enzimas proteolíticas, tratamento com ácidos fortes, metais pesados ou solventes orgânicos, que separem as macromoléculas.

[91] A determinação da capacidade de adsorção a enterobactérias foi realizada por testes *in vitro*. Para os bioensaios os extratos foram ressuspensos até concentração pré-determinada. Os

exemplos desta invenção comprovam a atividade dos extratos obtidos de microalgas.

[92] O ensaio realizado para verificação da atividade é uma adaptação das metodologias propostas por Becker *et al.* (2007) e Ganner *et al.* (2010). Essas metodologias determinam *in vitro* a capacidade de adsorção de enterobactérias através da relação densidade óptica (OD) x UFC.

[93] Análise estatística dos resultados obtidos mostrou que o extrato aquoso de *P. gyrans* e o extrato alcalino de *P. lutheri* apresentaram capacidade de ligação à *Salmonella* respectivamente maior e igual ao produto comercial utilizado como controle positivo.

[94] Os extratos aquosos e alcalinos obtidos a partir de microalgas podem ser utilizados para preparar uma composição alimentícia veterinária para tratar ou prevenir doenças gastrointestinais causadas por enterobactérias patogênicas.

EXEMPLOS

[95] A presente invenção é explicada em mais detalhes pelos exemplos a seguir, porém não é limitada pelos referidos exemplos.

Exemplo 1 – Obtenção de um extrato de microalgas marinhas com capacidade de adsorver enterobactérias

[96] A biomassa das microalgas *P. gyrans* e *P. lutheri* foi submetida, separadamente, aos mesmos procedimentos descritos detalhadamente a seguir. A biomassa foi ressuspensa em água (20 g/L), e submetida a agitação mecânica por 2 h a 80°C. Após esse período de extração o material foi centrifugado, e o sobrenadante teve seu volume reduzido em rotaevaporador seguido da adição de 3 volumes de etanol, para precipitação das macromoléculas. O material contendo etanol foi novamente centrifugado, e o pellet ressuspensa em água, dialisado, concentrado e liofilizado, essa fração foi denominada

PGAQ, quando obtida de *P. gyrans* e PLAQ quando obtida de *P. lutheri*. A biomassa residual foi submetida à extração alcalina em NaOH (20 g/L), com adição de NaBH₄ (5% m/m), e submetida a agitação mecânica por 2 h a 80°C. Após esse período de extração o material foi centrifugado, o sobrenadante neutralizado com HCl 1M e teve seu volume reduzido em rotaevaporador. Na sequência foram adicionados 3 volumes de etanol, para precipitação das macromoléculas. O material contendo etanol foi novamente centrifugado, e o pellet ressuspenso em água, dialisado, concentrado e liofilizado, essa fração foi denominada PGAL, quando obtida de *P. gyrans* e PLAL quando obtida de *P. lutheri*.

Tabela 1 – Caracterização química dos extratos obtidos a partir das microalgas marinhas *P. gyrans* e *P. lutheri*

Frações	Rend. (%)	Ptn	Cho	Composição monossacarídica (mol%)				
				Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
PGAQ	4,2	34,9	44,5	1,2	6,3	7,3	16,5	68,7
PLAL	7,6	11,7	45,7	12,3	17,8	25,4	10,4	34,1

PGAQ: Extrato aquoso de *P. gyrans*; PGAL: Extrato alcalino de *P. gyrans*; PLAQ: Extrato aquoso de *P. lutheri*; PLAL: Extrato alcalino de *P. lutheri*. Rend.: Rendimento das extrações (m/m); Cho: Carboidratos dosados pelo método de DUBOIS *et al.* (1956); Ptn: Proteínas dosadas pelo método de LOWRY *et al.* (1951); Monossacarídeos neutros quantificados na forma de acetato de alditóis, por GC-MS.

[97] Análise química da fração extraída com água de *P. gyrans* – PGAQ mostrou que essa apresenta alto teor de proteínas e carboidratos. Sendo que os carboidratos apresentam alto teor de glucose. A análise de Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ¹³C da fração PGAQ indicou que essa fração é majoritariamente constituída por β-D-glucanas (1→3)-ligadas, como indicado pelos sinais em 102,7

ppm (C-1) na região de carbono anomérico e em 86,0 ppm (C-3). O espectro também apresenta sinais entre 68,2 e 76,2 ppm referentes aos carbonos do anel (C-4, C-5, C-2), e em 60,7 ppm o sinal referente ao C-6 livre (RUTHES *et al.* (2007); RIZZI (2010); CARBONERO *et al.* (2006); AMARAL *et al.* (2008); BAO *et al.* (2001) CHENGHUA *et al.* (2000); VARUM *et al.* (1986).

[98] A fração PLAL obtida a partir da extração com álcali da microalga *P. lutheri* apresentou alto teor de proteínas e carboidratos, sendo que esses apresentaram uma heterogeneidade em relação à composição monossacarídica, os açúcares presentes em maior proporção foram glucose e manose. A análise de RMN de ^{13}C revela um espectro complexo, com a presença de sinais na região característica de proteínas, sinais referentes a presença de β -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas, como os descritos para a fração PGAQ, e outros sinais de menor intensidade referentes aos demais açúcares. Esses resultados indicam que essa fração é composta além de proteínas, por diferentes polissacarídeos como glucanas e heteropolissacarídeos.

Exemplo 2 – Avaliação da capacidade de adsorção a enterobactérias pelos extratos de microalgas marinhas

[99] Os testes foram realizados com a enterobactéria *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028, mantidas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*).

[100] Para realização do ensaio foram utilizadas placas de poliestireno de alta aderência de 96 poços, onde primeiramente foi plaqueada, em quintuplicata, 300 μL de uma suspensão da amostra, numa concentração de 1% dissolvidas em PBS, agitadas em vórtex e homogeneizadas em banho de ultrassom por 30 segundos por três vezes. Após incubação a 4°C durante 16-18 h, a placa foi lavada três vezes com 300 μL de PBS por poço. O bloqueio de espaços não

ocupados pela amostra e a prevenção de ligações inespecíficas se deu com 300 µL de BSA 1%, 4°C, durante 1 h, seguida de lavagem com 300 µL de PBS por três vezes.

[101] As bactérias utilizadas no teste foram cultivadas em meio BHI durante 24 h, a 37°C. A suspensão bacteriana teve sua densidade óptica ajustada para 0,1 (para verificação do tempo de detecção secundário), seguido de uma diluição de 1:10. Em seguida, adicionou-se aos poços, 300 µL dessa suspensão e incubados durante 60 min a 37°C para permitir sua ligação ao produto testado. Após lavagem, por seis vezes com 300 µL de PBS, para retirar as bactérias que não se ligaram ao produto, foi adicionado 200 µL de TSB (*Tryptic Soy Broth*), e uma gota de óleo de parafina, para que não houvesse evaporação do meio. A placa foi então incubada em leitor de microplacas a 37°C com leituras a cada 15 min a 690 nm, por 16 h.

[102] O controle de negativo consistiu em poços contendo apenas o bloqueio com BSA e a bactéria sem adicionar o produto a ser testado. O controle de crescimento consistiu em poços previamente bloqueados com BSA, contendo uma solução de bactérias em meio TSB, de modo que se possa acompanhar algum problema durante o crescimento das bactérias. Como controle positivo foi utilizado um produto comercial proveniente de levedura *S. cerevisiae*.

[103] Os resultados de densidade óptica coletados para cada uma das amostras foram tratados utilizando-se a metodologia proposta por Becker *et al.* (2007). Os dados coletados podem ser ajustados utilizando-se uma cinética de modelo sigmoidal como a mostrada na equação (1):

$$(1) \quad f_{OD}(t) = \frac{A}{1 + B^C/t^C}$$

[104] Nessa equação, $f_{OD}(t)$ denota a densidade óptica do meio contido em cada poço da placa no tempo t após a incubação

da mesma. O parâmetro A representa o valor da assíntota da densidade óptica no estado estacionário, B representa o tempo de incubação após o qual metade do rendimento máximo em biomassa foi obtido e C é uma constante que determina o ponto de inflexão da curva.

A primeira derivada, $f'_{OD}(t)$ é:

$$(2) \quad f'_{OD}(t) = \frac{AB^C C}{T^{C+1}(1 + B^C/t^C)^2}$$

[105] A partir dos parâmetros A, B e C é possível determinar parâmetros funcionais da curva como t_{pi} (Equação 3) que é o tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva, t_{det} (Equação 4) que determina a fase lag aparente e t_{OD} (Equação 5) que representa o tempo necessário para que a o meio atinja a OD de 0,1 a 690 nm, sendo esse o parâmetro mais importante na determinação da capacidade de aderência dos produtos testados a enterobactérias, visto que quanto menor o t_{OD} , ou o tempo necessário para que o meio retorne da OD 0,01 a OD 0,1, maior a sua capacidade de aderir as bactérias patogênicas.

$$(3) \quad t_{pi} = B(C - 1/C + 1)^{1/C}$$

$$(4) \quad t_{det} = \frac{t_{pi} - f_{OD}(t_{pi})}{f'_{OD}(t_{pi})}$$

$$(5) \quad t_{OD=0,1} = (B^C(-0,1)/0,1-A)^{1/C}$$

[106] Todos os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o programa R (R Core Team (2012)). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R->

project.org/.), aplicando-se o Test t de comparação de amostras duas a duas. O teste foi aplicado comparando-se o controle positivo (produto comercial) e controle negativo (com BSA apenas). A diferença estatística observada entre o controle negativo e controle positivo valida o teste. Comparou-se por fim os extratos, obtidos a partir de microalga, com o controle positivo. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 2 – Média das estimativas pontuais para os parâmetros de crescimento de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 em microplacas revestidas com extratos de microalgas

Frações	A(OD)	B(h)	C	t_{det} (h)	t_{pi} (h)	$t_{OD=0,1}$ (h)
Controle Negativo	0,33 (0,01)	6,97 (0,07)	10,27 (0,65)	6,84 (0,05)	4,75 (0,05)	6,41 (0,01)
Controle Positivo	0,30 (0,06)	6,25 (0,18)	11,68 (2,75)	6,15 (0,23)	3,98 (0,14)	5,87 (0,07)
PGAQ	0,39 (0,02)	5,87 (0,13)	8,57 (0,89)	5,71 (0,21)	3,67 (0,14)	5,19 (0,19)
PGAL	0,36 (0,02)	7,12 (0,28)	10,84 (1,04)	7,00 (0,52)	4,94 (0,29)	6,51 (0,27)
PLAQ	0,36 (0,02)	6,72 (0,21)	12,55 (1,56)	6,63 (0,13)	4,87 (0,20)	6,23 (0,21)
PLAL	0,34 (0,01)	6,48 (0,09)	9,78 (0,36)	6,35 (0,19)	4,01 (0,09)	5,92 (0,07)

PGAQ: Extrato aquoso de *P. gyrans*; PGAL: Extrato alcalino de *P. gyrans*; PLAQ: Extrato aquoso de *P. lutheri*; PLAL: Extrato alcalino de *P. lutheri*.

Nota: O desvio padrão é apresentado entre parênteses.

Tabela 3 – Análise estatística dos parâmetros de crescimento de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028 em microplacas revestidas com extratos de microalgas

Comparações	P valor		
	$t_{det}(h)$	$t_{pi}(h)$	$t_{OD=0,1}(h)$
Controle Negativo - Controle Positivo	0,0011610	0,0002235	0,0000487
PGAQ - Controle Positivo	0,0546200	0,0010350	0,0006208
PGAL - Controle Positivo	0,0107700	0,0012370	0,0044270
PLAQ - Controle Positivo	0,0002282	0,0031510	0,0153200
PLAL - Controle Positivo	0,8757000	0,0350300	0,2583000

PGAQ: Extrato aquoso de *P. gyrans*; PGAL: Extrato alcalino de *P. gyrans*;

PLAQ: Extrato aquoso de *P. lutheri*; PLAL: Extrato alcalino de *P. lutheri*.

[107] As frações PGAL e PLAQ, obtidas a partir da extração alcalina da microalga *Pavlova gyrans* e extração aquosa de *P. lutheri*, respectivamente, apresentaram-se estatisticamente iguais ao controle negativo, ou seja, não apresentam ação contra a adesão de *Salmonella*. Enquanto as demais, PGAQ e PLAL apresentaram-se melhores que o controle negativo com menor t_{OD} .

[108] A fração obtida a partir da extração aquosa da microalga *P. gyrans*, PGAQ, foi a que apresentou melhor resultado dentre as frações testadas, tendo atividade significativamente superior ao controle positivo (produto comercial), apresentando p de 0,05 para t_{det} e $p < 0,01$ para os parâmetros t_{pi} e t_{OD} .

[109] De acordo com análise estatística a fração alcalina de *P. lutheri*, PLAL, não apresentou diferença significativa ao controle positivo. Desta forma, a capacidade de adesão à *Salmonella* é tão boa quanto o controle positivo (produto comercial) testado. Este dado é bastante interessante visto o valor comercial do produto comercial em relação ao obtido de microalgas.

[110] Ambas as frações com maior capacidade de adesão à *Salmonella*, PGAQ e PLAL, contém alto teor de proteínas e carboidratos. A fração PGAQ apresenta β -glucanas (1→3)-ligadas como polissacarídeo majoritário, enquanto a fração PLAL, apresentou além de

β -glucanas, a presença de outros polissacarídeos constituídos por diferentes açúcares, entre eles manose e xilose.

[111] Esses resultados indicam a potencialidade do uso desses extratos de microalgas, principalmente o aquoso de *P. gyrans* e alcalino de *P. lutheri*, para preparação de uma composição alimentícia veterinária para ser para tratar ou prevenir Salmonelose em animais.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição veterinária para tratar ou prevenir infecções bacterianas **caracterizada** por compreender extrato microalgal associado a um ou mais ingredientes ou aditivos para alimentação animal.
2. Composição veterinária, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por o extrato microalgal ser derivado de microalgas do gênero *Pavlova*, preferencialmente das espécies *Pavlova lutheri* ou *Pavlova gyrans*.
3. Composição veterinária, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por o extrato microalgal compreender proteínas e carboidratos.
4. Composição veterinária, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de o extrato microalgal compreender entre 5-70% do peso seco do material de proteínas e entre 5-85% do peso seco do material de carboidratos.
5. Composição veterinária, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de os carboidratos compreenderem polissacarídeos, preferencialmente polissacarídeos do tipo β -Glucanas (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas ou β -Glucanas (1 $\rightarrow$ 3,6)-ligadas.
6. Uso da composição veterinária, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** por ser para tratar ou prevenir infecções bacterianas.
7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de as infecções bacterianas serem causadas por enterobactérias patogênicas, preferencialmente do gênero *Salmonella*.