



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

**(21) BR 10 2012 031011-2 A2**

(22) Data de Depósito: 05/12/2012  
(43) Data da Publicação: 02/09/2014  
(RPI 2278)



**(51) Int.Cl.:**

A01N 63/02  
A01P 1/00  
C07J 9/00  
C07J 31/00  
C07J 41/00

**(54) Título:** PROCESSO DE INIBIÇÃO E/OU CONTROLE DE BIOFILME UTILIZANDO N-(3-SULFOOXI-25-COLEST-5-EN-26-OIL)-L-ISOLEUCINA, NATURAL OU SINTÉTICA, OU SEUS DERIVADOS (NATURAIS OU SINTÉTICOS)

**(73) Titular(es):** Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

**(72) Inventor(es):** Alexandre José Macedo, Carlos Termignoni, Karine Rigon Zimmer, Raquel Brandt Giordani

**(57) Resumo:** PROCESSO DE INIBIÇÃO E/OU CONTROLE DE BIOFILME UTILIZANDO N-(3-SULFOOXI-25-COLEST-5-EN-26-OIL)-L-ISOLEUCINA, NATURAL OU SINTÉTICA, OU SEUS DERIVADOS (NATURAIS OU SINTÉTICOS). O presente relatório descritivo descreve um processo para evitar e/ou controlar o (s) biofilme (s) em qualquer superfície, utilizando N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos). N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina é um composto presente na cera que reveste a superfície dos ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (boophilus) microplus*, podendo também ser isolado de outra espécie de carrapato, e que apresenta atividade de inibir a formação de biofilmes microbianos.

### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

PROCESSO DE INIBIÇÃO E/OU CONTROLE DE BIOFILME UTILIZANDO *N*-(3-SULFOOXI-25-COLEST-5-EN-26-OIL)-L-ISOLEUCINA, NATURAL OU SINTÉTICA, OU SEUS DERIVADOS  
(NATURAIS OU SINTÉTICOS)

5        **Campo da invenção**

O presente relatório descritivo descreve um processo para evitar e/ou controlar biofilme(s) em qualquer superfície utilizando *N*-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-*isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos). *N*-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-*isoleucina* é um composto presente na cera que reveste a superfície dos ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, podendo também ser isolado de outra espécie de carrapato, e que apresenta atividade de inibir a formação de biofilmes microbianos.

10        **Estado da técnica**

Os biofilmes têm recebido atenção considerável nos últimos anos, em razão da sua ubiquidade em ambientes naturais, clínicos e industriais. Há grande preocupação com a resistência apresentada pelas bactérias que os constituem a antibióticos e ao sistema de defesa dos hospedeiros infectados. Quando aderidas, bactérias apresentam uma profunda resistência, rendendo as células do biofilme 10 a 1000 vezes menos susceptíveis a vários agentes antimicrobianos que a mesma bactéria vivendo na forma livre ou planctônica. O crescimento não desejado de biofilmes tem impacto negativo em várias atividades (DAVIES, D. UNDERSTANDING BIOFILM RESISTANCE TO ANTIBACTERIAL AGENTS. NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 2, 114-122, 2003). Danos em equipamentos resultantes da biocorrosão, contaminação de produtos, perdas energéticas, redução da transferência de calor e perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos do acúmulo de biofilmes microbianos e representam perdas significativas para as indústrias. Além disso, biofilmes têm sido crescentemente reconhecidos como sendo importantes em doenças humanas, de animais e de plantas (RASMUSSEN, T.B. & GIVSKOV, M. QUORUM SENSING INHIBITORS: A BARGAIN OF EFFECTS. MICROBIOLOGY, 152, 895-904, 2006). A maioria das infecções envolvem biofilmes bacterianos. Conforme ARCIOLA, C.R., MONATANARO, L. & COSTERTON, J.W. NEW TRENDS IN DIAGNOSIS AND

CONTROL STRATEGIES FOR IMPLANT INFECTIONS. THE INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS, 34, 727-736, 2011, mais de 80% das bactérias na natureza vivem organizadas em comunidades conhecidas como biofilmes. A formação do biofilme tem um papel importante na patogênese e é uma causa comum de infecções persistentes (DAVIES, D. UNDERSTANDING BIOFILM RESISTANCE TO ANTIBACTERIAL AGENTS. NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 2, 114-122, 2003). Várias doenças estão associadas a biofilmes bacterianos, incluindo colites, uretrites, conjuntivites, vaginites, otites, bem como a fibrose cística, que já está bem documentada. A utilização de antimicrobianos ineficazes na presença de biofilme aumenta o tempo de internação, onerando o sistema de saúde, elevando as taxas de resistência aos antimicrobianos e a disseminação de bactérias multirresistentes.

Em decorrência do envolvimento de biofilmes em um amplo espectro de atividades humanas, o interesse na busca por moléculas capazes de inibir ou destruir biofilmes microbianos é de extremo interesse e relevância.

A molécula N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oi)-L-isoleucina também identificada pelo registro no Chemical Abstracts - 199536-52-2 foi primeiramente identificada e caracterizada por POTTERAT et al. (*Boophiline, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick Boophilus microplus, Helvetica Chimica Acta (1997), 80(7), 2066-2072*). O grupo de POTTERAT (POTTERAT, O., HOSTETTMANN, K., HÖLTZEL, A., JUNG, G., DIEHL, P.A. & PETRINI, O. BOOPHILINE, AN ANTIMICROBIAL STEROL AMIDE FROM THE CATTLE TICK BOOPHILUS MICROPLUS. HELVETICA CHIMICA ACTA, 80, 2066-2072, 1997) relatou que esta molécula, batizada de Boophiline exibiu atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e antibiótica contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

O depósito de patente US 20100009927 A1 *Anti-inflammatory and anti-allergy extracts from nettle* de Alberte, Randall S.; Roschek, William P., Jr.; Li, Dan, relata um extrato natural contendo a molécula Boophiline em sua composição. É reivindicado neste depósito americano de patente o uso deste extrato para tratamento ou prevenção de alergias sazonais, rinite alérgica e outras condições de inflamação.

Na literatura científica existem apenas dois relatos de esteroides que inibem o crescimento de microrganismos e consequentemente o biofilme destes. A molécula

CSA-13 descrita em SAVAGE, P.B., LI, C., TAOTAFU, U., DING, B. & GUAN, Q. ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF CATIONIC STEROID ANTIBIOTICS. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 217, 1–7, 2002, e SAVAGE, P.B. CATIONIC STEROID ANTIBIOTICS. CURR. MED. CHEM. ANTI-INFECTIVE AGENTS, 3, 293–304, 2002. SAVAGE, P.B. DESIGN, SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CATIONIC PEPTIDE AND STEROID ANTIBIOTICS. EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, 2002, 759–768, 2002, possui um modo de ação completamente distinto do proposto pela presente patente, pois atua como biocida, isto é, elimina a população de células microbianas via morte (NAGANT, C., FENG, Y., LUCAS, B., BRAECKMANS, K., SAVAGE, P. & DEHAYE, J.P. EFFECT OF A LOW CONCENTRATION OF A CATIONIC STEROID ANTIBIOTIC (CSA-13) ON THE FORMATION OF A BIOFILM BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY 111, 763-772, 2011). Da mesma forma, D2S (“disubstituted dexamethasone-spermine”), um corticosteroide catiônico, apresenta um amplo espectro de atividade antibacteriana, atuando no biofilme por uma via distinta da proposta por esta reivindicação (BUCKI, R., LESZCZYNSKA, K., BYFIELD, F.J., FEIN, D.E., WON, E., CRUZ, K., NAMLOT, A., KULAKOWSKA, A., NAMLOT, Z., SAVAGE, P.B, DIAMOND, S.L. & JANMEY P.A. COMBINED ANTIBACTERIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF A CATIONIC DISUBSTITUTED DEXAMETHASONE-SPERMINE CONJUGATE. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 54, 2525-2533, 2010).

Especificamente, moléculas esteroides capazes de inibir a adesão bacteriana e/ou a formação de biofilmes, sem afetar o crescimento (ou seja, sem causar morte bacteriana) não estão descritas até o momento, sendo *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, a primeira molécula descrita com capacidade de inibir a adesão bacteriana e/ou a formação de biofilmes, sem afetar o crescimento, ou seja, sem causar morte celular bacteriana.

### **Sumário da invenção**

A presente invenção compreende um processo de inibição da formação de biofilmes utilizando a molécula *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina* como agente inibidor. A molécula em questão pode ser utilizada tanto *in natura* quanto

extraída e/ou sintética. O contato da substância ativa, *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, em sua forma pura ou presente em ovos do carrapato *R. microplus* com uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa* inibe a formação de biofilmes desta bactéria.

#### 5 **Descrição detalhada da invenção**

O processo de inibição e/ou controle do biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos) compreende duas metodologias distintas, a saber: (i) o uso da molécula *in natura* presente na composição dos ovos do carrapato *R. microplus* e/ou o (ii) o uso do extrato proveniente da retirada da cera que reveste os ovos de *R. microplus* (iii) uso da molécula sintética e/ou extraída do extrato dos ovos do carrapato *R. microplus*.

Para a metodologia (i), temos que, ovos do carrapato *R. microplus* são usados como superfície para a formação de biofilme. Estes ovos são colocados em contato com uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa* (RAHME, L.G., STEVENS, E.J., WOLFORT, S.F., SHAO, J., TOMPKINS, R.G. & AUSUBEL, F.M. COMMON VIRULENCE FACTORS FOR BACTERIAL PATHOGENICITY IN PLANTS AND ANIMALS. SCIENCE 268, 1899-1902, 1995). Os ovos utilizados podem ser *in natura*; ou ovos que foram processados para retirada da cera de revestimento por meio de mistura de solventes orgânicos e aquoso (clorofórmio, metanol e água, ARRIETA, M.C., LESKIW, B.K. & KAUFMAN, W.R. ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN THE EGG WAX OF THE AFRICAN CATTLE TICK *AMBLIOMMA HEBRAEUM* (ACARI: IXODIDAE). EXPERIMENTAL AND APPLIED ACAROLGY 39, 297-313, 2006).

Para a metodologia (ii), pode-se utilizar o extrato da cera dos ovos de *R. microplus*. Este extrato foi obtido através de processo extrativo seguindo o protocolo de ARRIETA *et al.* (2006). *P. aeruginosa* é cultivada durante 24 h a 37 °C em microplacas estéreis em presença de caldo Luria Bertani (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1%) e diferentes concentrações do extrato da cera do ovo. Superfícies de vidro (tubos de vidro e/ou lamínulas) podem ser utilizadas para testar o desempenho do extrato da cera dos ovos.

Para a metodologia (iii), pode-se utilizar a molécula *N*-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-*L*-isoleucina extraída diretamente de ovos de *R. microplus* e / ou obtida de forma sintética e /ou semi sintética.

A molécula, *N*-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-*L*-isoleucina, é capaz de inibir a adesão bacteriana e a formação de biofilme de *P. aeruginosa* na seguinte faixa de concentração: 0,5 - 4.0 mM, não inibindo o crescimento bacteriano. A metodologia para a quantificação do biofilme utilizando uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa* foi realizada segundo TRENTIN *et al.*, (TRENTIN, D.S., GIORDANI, R.B., ZIMMER, K.R., DA SILVA, A.G., DA SILVA, M.V., CORREIA, M.T., BAUMVOL, I.J. & MACEDO, A.J. POTENTIAL OF MEDICINAL PLANTS FROM THE BRAZILIAN SEMI-ARID REGION (CAATINGA) AGAINST *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* PLANKTONIC AND BIOFILM LIFESTYLES. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY 137, 327-335, 2011). *P. aeruginosa* é cultivada durante 16 h a 37 °C em microplacas estéreis em presença de caldo Luria Bertani (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1%) e diferentes concentrações da molécula *N*-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-*L*-isoleucina. Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos, são apresentados abaixo exemplos, não limitantes.

### **Exemplo 1**

Ovos do carrapato *R. microplus* são colocados em contato com uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa* (RAHME *et al.*, 1995). Após incubação por 24 h a 37 °C, os ovos examinados em microscópio eletrônico de varredura se apresentam como na Figura 1. Nos ovos cuja camada de cera foi removida, é observada a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (Fig. 1A-C). Já nos ovos cuja camada de cera não foi retirada (*in natura*) não é observada a formação de biofilme ou adesão celular bacteriana (Fig. 1D-F).

Em A, B e C, verifica-se o biofilme formado sobre os ovos submetidos ao processo de extração da cera do ovo e em D, E e F, ovos com a cera na sua superfície.

### **Exemplo 2**

*P. aeruginosa* é cultivada durante 24 h a 37 °C em microplacas estéreis de 96 poços de poliestireno em presença de caldo Luria Bertani (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1%) e diferentes concentrações do extrato da cera do ovo. Utilizando o método do cristal violeta para a quantificação de biofilme conforme  
5 TRENTIN *et al.* (2011), observa-se menor adesão bacteriana e formação de biofilme nos poços contendo extrato da cera de ovos de *R. microplus* nas concentrações de 2,5 mg/mL e 5 mg/mL comparado aos poços não tratados com o extrato da cera (Fig. 2A). Pode-se notar que o extrato da cera dos ovos inibiu o biofilme de *P. aeruginosa* sem inibir seu crescimento (Fig. 2B). Além disso, superfícies de vidro (tubos de vidro e  
10 lamínulas de 5 mm x 5 mm) podem ser utilizadas para testar a performance do extrato da cera dos ovos (Fig. 3). Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura observa-se uma completa inibição da adesão bacteriana e formação de biofilme na lamínula de vidro onde *P. aeruginosa* foi tratada com o extrato (Fig. 3C e D). Da mesma forma que para a superfície de poliestireno, na amostra tratada com 2,5 mg/mL do extrato da cera  
15 do ovo houve menor adesão bacteriana e formação de biofilme no tubo de vidro quando quantificado pelo método do cristal violeta (Fig. 3F).

### **Exemplo 3**

O processo de extração de *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina* é realizado a partir do extrato da cera de ovos de *R. microplus* submetido a uma extração  
20 em fase sólida com coluna de fase reversa C<sub>18</sub>. O extrato foi eluído utilizando o seguinte sistema: água (4 mL), água:metanol (95:5, 4 mL), água:metanol (90:10, 4 mL), água:metanol (85:15, 4 mL), água:metanol (80:20, 4 mL), água:metanol (50:50, 4 mL), água:metanol (25:75, 4 mL), metanol (4 mL), acetonitrila (4 mL) e clorofórmio (4 mL) gerando 81 frações. A presença de atividade antibiofilme de cada uma das frações  
25 obtidas foi testada usando o ensaio do cristal violeta como mencionado anteriormente. O grau de pureza da fração apresentando a atividade antibiofilme foi avaliado por diferentes técnicas: cromatografia em camada delgada uni e bidimensional utilizando placas de sílica de fase normal e fase reversa (C<sub>18</sub>) com as seguintes fases eluentes: butanol:ácido acético:água, clorofórmio:metanol, acetato de etila:metanol, acetato de  
30 etila:acetona:ácido acético:água e acetato de etila:ácido fórmico:água e diversos reveladores químicos incluindo: anisaldeído sulfúrico, ninhidrina, reagente de

Dragenddorff, vapor de iodo, cloreto de alumínio 1%, cloreto férrico 2%, hidróxido de potássio 5% e reagente natural.

O composto presente na fração que apresentava alto grau de pureza e continha a atividade desejada de inibição do biofilme foi analisado pelas técnicas de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais, espectrometria de massas de baixa e alta resolução, análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e ponto de fusão para determinação da estrutura da molécula antibiofilme. O processo de extração da cera dos ovos de *R. microplus* e subsequente purificação por extração em fase sólida forneceu um composto com as seguintes características:

- 10 - Pó branco amorfo, ponto de fusão: 151-154°C; cromatografia em camada delgada (butanol/ácido acético/água,75:25:7 v/v): RF=0.8; <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, metanol-d<sub>4</sub>): δ 1.10 (m, 1H, 1α-H), 1.88 (m, 1H, 1β-H), 2.07 (m, 1H, 2α-H), 1.63 (m, 1H, 2β-H), 4.14 (ddt, 1H, 3α-H. J=12, 10, 5), 2.52 (dd br, 1H, 4α-H, J=14, 5), 2.34 (dd br, 1H, 4β-H, J=14, 12) 5.38 (s, 1H, 6-H), 1.54 (m, 1H, 7α-H), 1.99 (m, 1H, 7β-H), 1.46  
15 (m, 1H, 8β-H), 0.94 (m, 9α-H), 1.52 (m, 2H, 11-H), 1.17 (m, 1H, 12α-H), 2.05 (m, 1H, 12β-H), 1.11 (m, 1H, 14α-H), 1.60 (m, 1H, 15α-H), 1.10 (m, 1H, 15β-H), 1.85 (m, 1H, 16α-H), 1.29 (m, 1H, 16β-H), 1.00 (m, 1H, 17α-H), 0.70 (s, 3H, 18-H), 1.03 (s, 3H, 19-H), 1.38 (m, 1H, 20-H), 0.96 (s, 3H, 21-H), 1.25 (m, 1H, 22-H), 1.6 (m, 1H, 22'-H), 1.18 (m, 1H, 23-H), 1.38 (m, 1H, 23'-H), 1.05 (m, 1H, 24-H), 1.38 (m, 1H, 24'-H), 2.44  
20 (m, 1H, 25-H), 0.96 (d, 3H, J=7, 26-H), 4.28 (m, 1H, AA-α-H), 2.12 (m, 2H, AA-γ-H), 0.96 (m, 3H, AA-δ-H), 0.9 (m, 3H, AA-Me-β-H), 0.75 (d, 3H, J=7, AA-Me-δ-H); <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 36.9 (C1), 29.0 (C-2), 75.2 (C-3), 38.5 (C-4), 140.7 (C-5), 121.0 (C-6), 31.4 (C-7 e C-8), 49.5 (C-9), 36.1 (C-10), 20.6 (C-11), 40.8 (C-12), 41.8 (C-13), 56.1 (C-14), 23.8 (C-15), 27.8 (C-16), 55.5 (C-17), 11.7 (C-  
25 18), 19.2 (C-19), 35.1 (C-20), 18.5 (C-21), 35.5 (C-22), 23.2 (C-23), 34.4 (C-24), 40 (C-25), 174.9 (C-26), 18.1 (C-27), 175.8 (AA-COOH), 57.0 (AA-C-α), 36.9 (AA-C-β), 24.7 (AA-C-γ), 15.6 (AA-C-δ), 11.2 (AA-C-β-Me); IR (KBr): 3463, 2938, 2868, 1719, 1654, 1534, 1459, 1361, 1199, 1061, 977 cm<sup>-1</sup>; UV/vis: λ<sub>max</sub> 210 nm; HRMS (m/z): [M]<sup>+</sup> calculada para C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>7</sub>S, 609,3621; encontrada, (609,3618);  
30 análise elementar (% calculada, % encontrada para C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>7</sub>S.5H<sub>2</sub>O): C (57.5, 56.5),

H (9.4, 8.7), N (2.0, 2.4), S (4.6, 4.3). Esta molécula foi comprovadamente identificada como sendo *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoileucina* (Fig. 4).

#### **Exemplo 4**

5 A molécula *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoileucina* colocada em contato com uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa* seguindo a metodologia também descrita por TRENTIN *et al.*, 2011 e após incubação por 16 h a 37 °C é capaz de inibir a adesão bacteriana e a formação de biofilme de *P. aeruginosa* nas seguintes concentrações: 0.512, 1.0, 2.0 e 4.0 mM (Fig. 5) não inibindo o crescimento bacteriano (Fig. 5).

#### 10 **Descrição das figuras**

**Fig. 1.** Formação de biofilme de *P. aeruginosa* sobre ovos do carrapato *R. microplus*.

**Fig. 2.** Formação de biofilme de *P. aeruginosa* em placas de 96 poços de poliestireno quantificada pelo método do cristal violeta frente a diferentes concentrações do extrato da cera dos ovos (A). Em B avaliação do crescimento bacteriano monitorado pela 15 absorvância a 600 nm. Gentamicina (a uma concentração de 6 µg/mL) foi utilizada como controle do crescimento bacteriano.

**Fig. 3.** Formação de biofilme em lamínula e tubo de vidro em amostra não tratada (A, B e E) e tratada com 2,5 mg/mL do extrato da cera do ovo (C, D e F), demonstrada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura e pela técnica do cristal violeta.

20 **Fig. 4.** Estrutura química de *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoileucina*.

**Fig. 5.** Formação de biofilme em placa de 96 poços de poliestireno em amostra tratada com diferentes concentrações do *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoileucina* (boophilina) sem inibir o crescimento bacteriano, demonstrada pela técnica do cristal violeta (gráfico e figura) e pela absorvância a 600 nm, respectivamente. As amostras 25 foram tratadas por um período de 16 h a 37°C.

**Fig. 6.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *P. aeruginosa* não tratado (A e B) e tratado com *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoileucina* (na concentração de 4.0 mM). As amostras foram tratadas por um período de 16 h a 37°C.

### Reivindicações

- 1- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), **caracterizado** por utilizar a molécula *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina* i) *in natura* presente na composição dos ovos do carrapato *R. microplus* e/ou ii) no extrato proveniente da retirada da cera que reveste os ovos de *R. microplus* e/ou iii) a molécula sintética e/ou extraída dos ovos do carrapato *R. microplus*.
- 2- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelos ovos do carrapato *R. microplus* serem colocados em contato com uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa*.
- 3- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender o extrato da cera dos ovos de *R. microplus*.
- 4- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo extrato da cera dos ovos do carrapato *R. microplus* serem colocados em contato com uma suspensão da bactéria *P. aeruginosa*.
- 5- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender a molécula *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina* extraída diretamente de ovos de *R. microplus* e / ou obtida de forma sintética e /ou semi sintética.
- 6- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-isoleucina*, natural ou sintética, ou seus derivados

(naturais ou sintéticos), de acordo com as reivindicações 1-5, **caracterizado** por compreender *P. aeruginosa* cultivada a 37 °C em microplacas estéreis em presença de caldo Luria Bertani (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1%) e diferentes concentrações do extrato da cera do ovo e ou da molécula ativa.

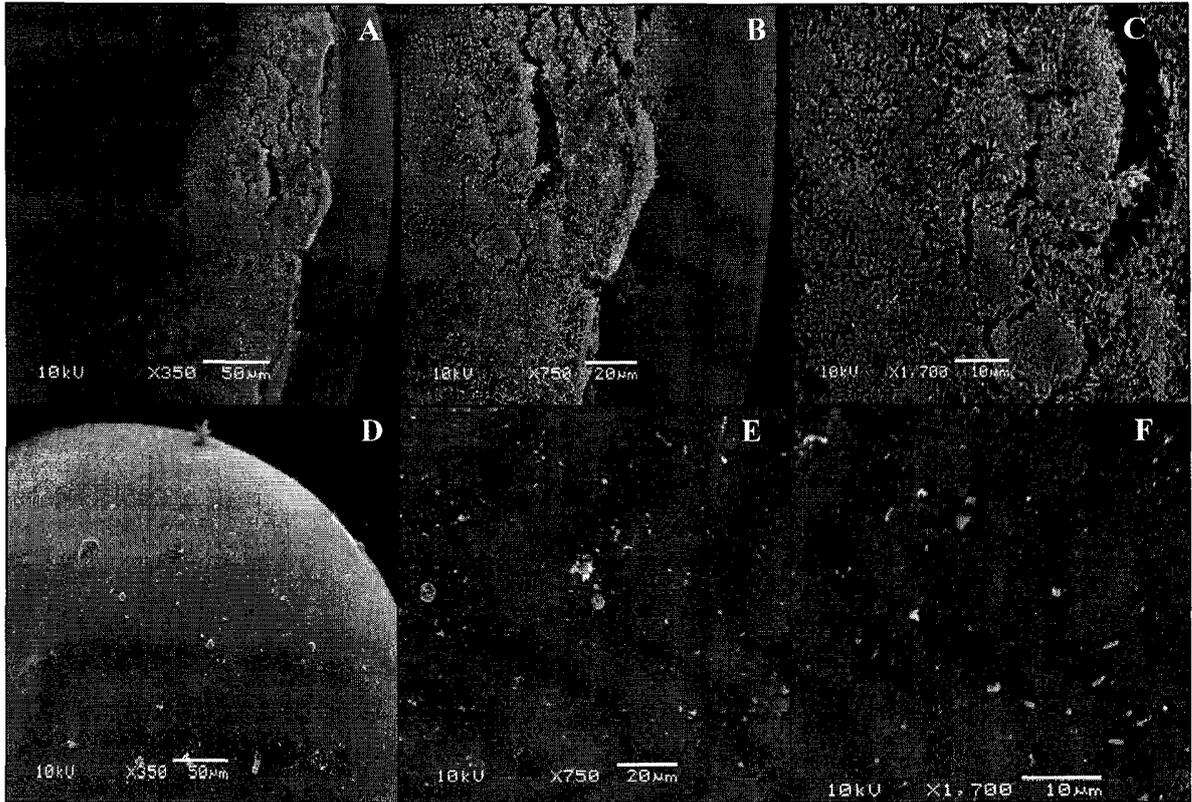
5  
7- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-iso-leucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), de acordo com as reivindicações 1-6, **caracterizado** por compreender o extrato da cera dos ovos do carrapato *R. microplus* numa faixa de concentração de 2,5 -5,0 mg/mL.

10  
8- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-iso-leucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), de acordo com as reivindicações 1-6, **caracterizado** por compreender a molécula *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-iso-leucina* numa faixa de concentração de 0,5 - 4,0 mM.

15  
9- Processo de inibição e/ou controle de biofilme utilizando *N-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-L-iso-leucina*, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos), de acordo com as reivindicações 1-8, **caracterizado** por ser para inibir a adesão de qualquer microrganismo sobre qualquer superfície biótica (célula, tecidos, órgãos, mucosas, entre outros) e/ou sobre qualquer superfície abiótica (polímeros e plásticos de qualquer constituição, metais de qualquer constituição tratados ou não quimicamente ou por processos físicos, madeira, papel e derivados de celulose, couro e qualquer tecido animal ou vegetal processado ou não, cerâmicas de qualquer constituição).

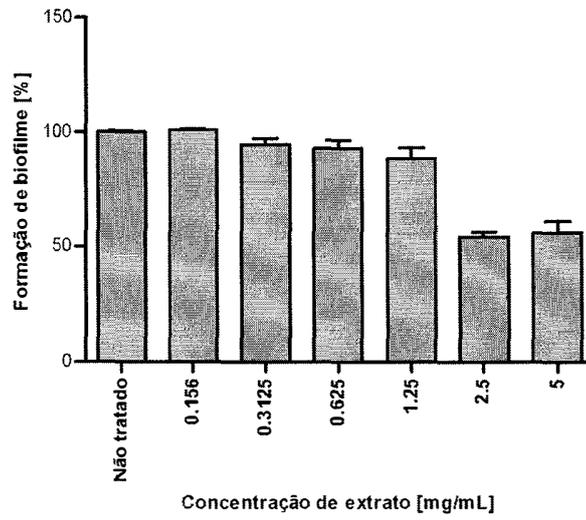
20

**Figuras**

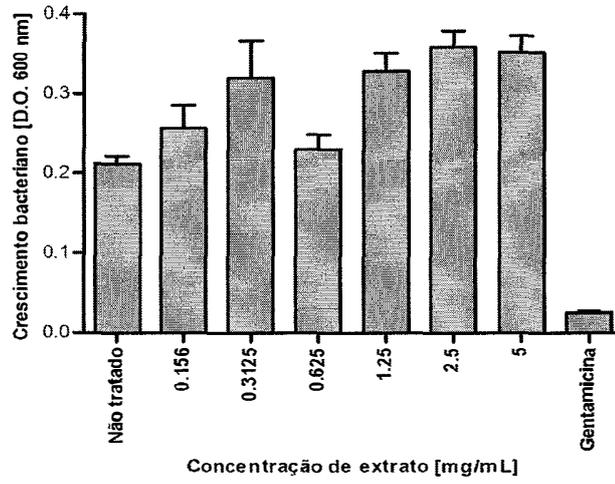


**Figura 1**

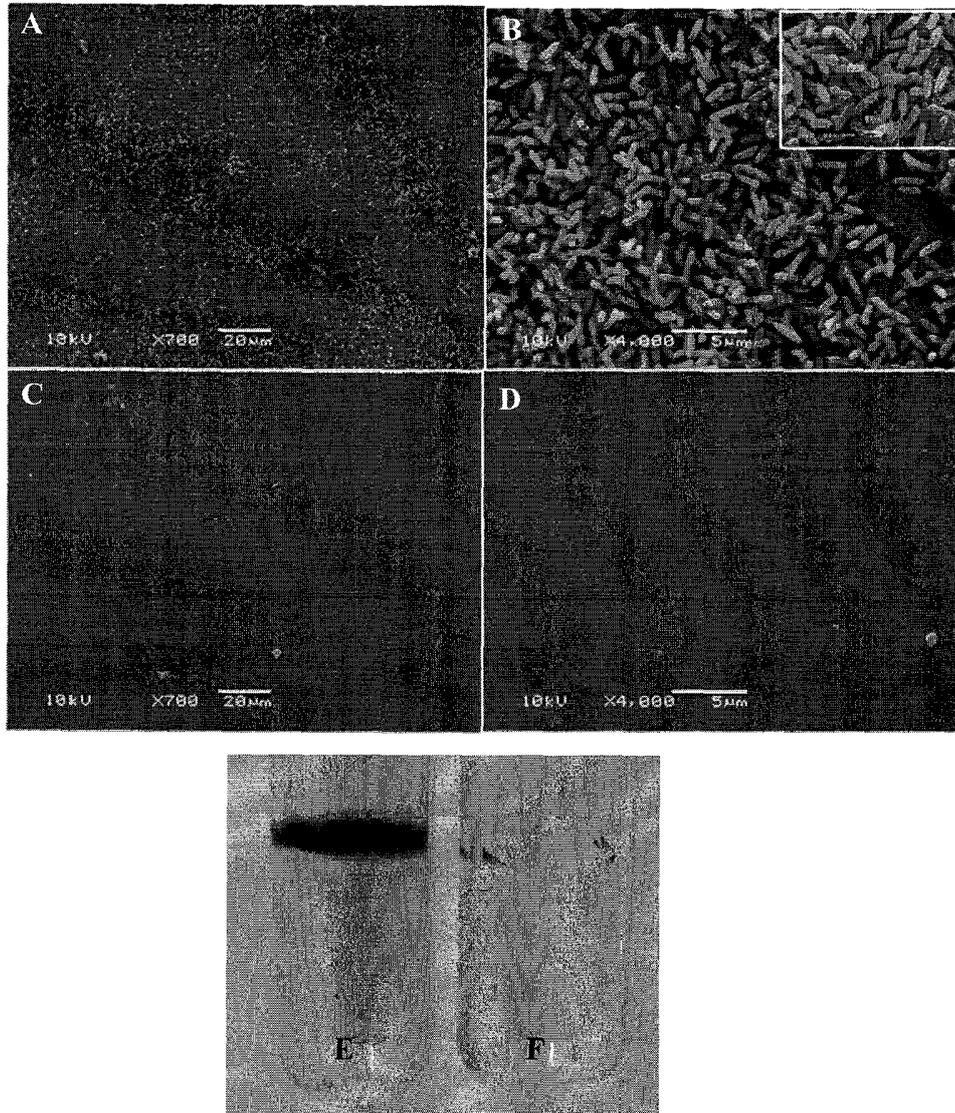
**A**



**B**



**Figura 2**



**Figura 3**

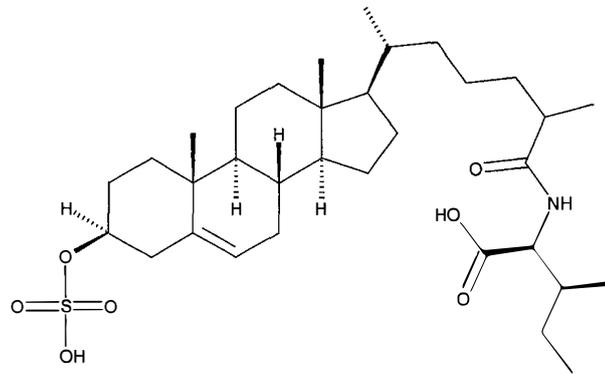


Figura 4

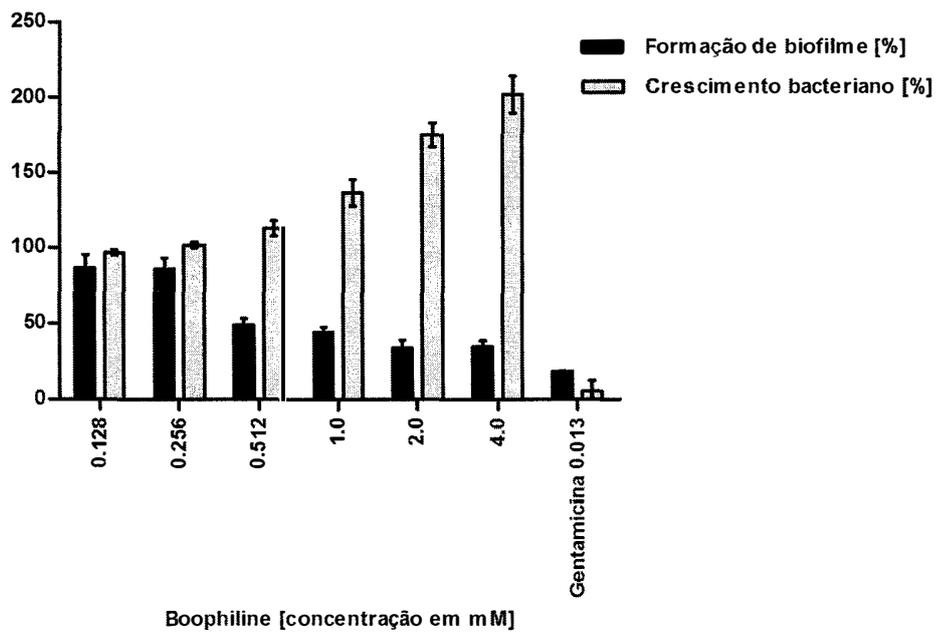
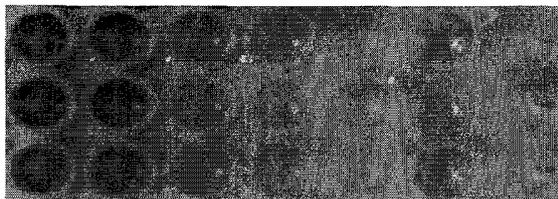
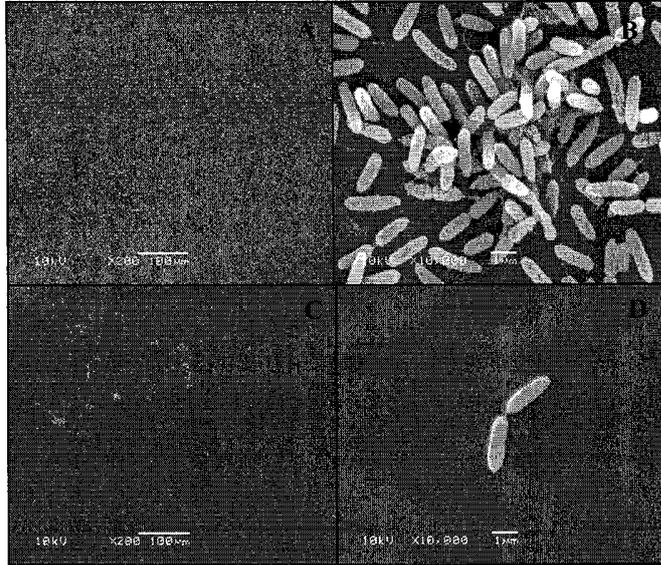


Figura 5



**Figura 6**

**Resumo**

PROCESSO DE INIBIÇÃO E/OU CONTROLE DE BIOFILME UTILIZANDO *N*-(3-SULFOOXI-25-COLEST-5-EN-26-OIL)-*L*-ISOLEUCINA, NATURAL OU SINTÉTICA, OU SEUS DERIVADOS  
(NATURAIS OU SINTÉTICOS)

5 O presente relatório descritivo descreve um processo para evitar e/ou controlar o  
(s) biofilme (s) em qualquer superfície utilizando *N*-(3-sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-  
*L*-isoleucina, natural ou sintética, ou seus derivados (naturais ou sintéticos). *N*-(3-  
sulfooxi-25-colest-5-en-26-oil)-*L*-isoleucina é um composto presente na cera que  
10 reveste a superfície dos ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*,  
podendo também ser isolado de outra espécie de carrapato, e que apresenta atividade de  
inibir a formação de biofilmes microbianos.