



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

(21) BR 10 2013 020947-3 A2



(22) Data de Depósito: 16/08/2013

(43) Data da Publicação: 14/07/2015
(RPI 2323)

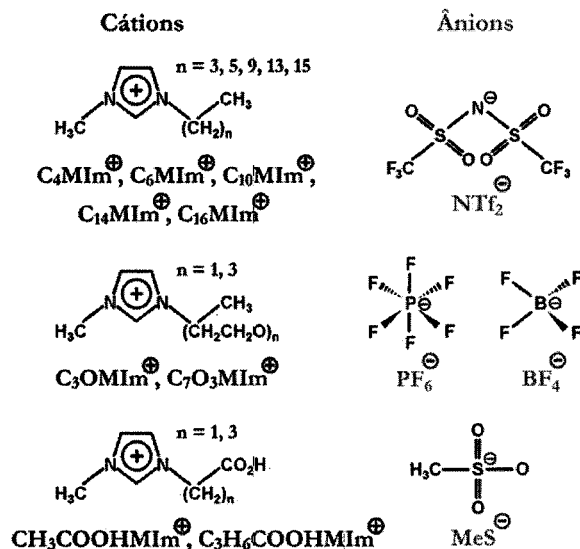
(54) **Título:** USO DE SAIS IMIDAZÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES PATOGÊNICOS E MULTIRRESISTENTES

(51) **Int.Cl.:** C07D233/54; A61K31/4164; A61P31/10

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS

(72) **Inventor(es):** ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA, HENRI STEPHAN SCHREKKER, RICARDO KEITEL DONATO

(57) **Resumo:** USO DE SAIS IMIDAZÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES PATOGÊNICOS E MULTIRRESISTENTES A presente invenção descreve um grupo de substâncias sintéticas atóxicas com ação antifúngica, com capacidade de remoção do biofilme leveduriforme, bem como ação preventiva de sua formação (atividade antibiofilme). Esse relatório descreve a aplicação dos sais imidazólicos, alvo da invenção, contra fungos leveduriformes patogênicos ao homem e aos animais endotérmicos (sangue quente), assim como sua aplicação sobre células fúngicas com capacidade de adesão sobre superfícies policarbonadas, denominadas de células de biofilme. Os sais imidazólicos podem ser utilizados como substâncias removedoras ou inibidoras da formação de biofilme, conservantes de produtos de uso farmacêutico, cosmético ou alimentício (como aditivo alimentar) ou diretamente como droga antifúngica terapêutica, por possuir atividade biológica equivalente a fármacos antifúngicos de referência para estrutura molecular proposta nas drogas sintéticas alvo desta invenção.



USO DE SAIS IMIDAZÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE
FUNGOS LEVEDURIFORMES PATOGÊNICOS E MULTIRRESISTENTES

Campo da invenção

A presente invenção descreve um grupo de substâncias sintéticas com ação
5 antifúngica e antibiofilme visando sua aplicação contra fungos patogênicos
leveduriformes ao homem e aos animais endotérmicos (sangue quente), assim
como células fúngicas com capacidade de adesão sobre superfícies
policarbonadas, denominadas de células de biofilme. Os agentes antifúngicos
alvo da invenção podem ser utilizados como substâncias conservantes de
10 produtos farmacêuticos, cosméticos ou alimentícios (como aditivo alimentar) ou
diretamente como droga antifúngica terapêutica, por possuir atividade biológica
equivalente a fármacos antifúngicos de referência.

Antecedentes da invenção

Atualmente, o número de drogas antifúngicas é extremamente limitado,
15 especialmente quando comparado ao número de fármacos antibacterianos
disponíveis. Isto torna ainda mais difícil sobrepor a resistência a drogas
antifúngicas, transformando infecções fúngicas resistentes em um sério risco à
saúde. Infecções fúngicas estão atualmente entre as principais causas de
morte por infecções em hospitais (Azie, N., Neofytos, D., Pfaller, M., Meier-
20 Kriesche, H.U., Quan, S.P. & Horn, D. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 73, 293
(2012)).

O grupo imidazol é frequentemente encontrado em substâncias com
atividade biológica, incluindo agentes antifúngicos como o cetoconazol,

miconazol, bifonazol, butoconazol, clorotrimazol, econazol, fenticonazol, isoconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol e tioconazol. Outras medicações antifúngicas relacionadas são as triazólicas (albaconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, terconazol, voriconazol) e as tiazólicas (abafungin). Os antifúngicos imidazólicos, triazólicos e tiazólicos inibem a enzima lanosterol 14 α -demetilase; a enzima necessária para converter lanosterol em ergosterol e assim promover a biossíntese da membrana celular fúngica (Kanafani, Z.A. & Perfect, J.R. Clin. Infect. Dis. 46, 120 (2008)).

10 O **Cetoconazol**, nome genérico do *cis-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxil]fenil] piperazina* (nome IUPAC), fórmula química $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$, foi o primeiro antifúngico imidazólico proposto na literatura. A invenção foi originalmente descrita por Heeres *et al.* na U.S. Pat. No. 4.335.125 na qual destaca sua atividade antifúngica *in vitro* 15 contra fungos leveduriformes e filamentosos. A ação antifúngica tópica do cetoconazol foi em seguida descrita por Rosenberg *et al.* na U.S. Pat. No. 4.569.935. Posteriormente ao cetoconazol, ocorreu a descrição da ação tópica antifúngica do **Nitrato de Miconazol** (U.S. Pat. No. 3.717.655), nome genérico do *(RS)-1-[2-(2,4-diclorobenziloxi)-2-(2,4-diclorofenil)-etil]-1H-imidazol* (nome 20 IUPAC), fórmula química $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$, possui um espectro de ação mais amplo e efetivo contra dermatófitos e leveduras patogênicas, apresentando seu uso em diferentes apresentações farmacêuticas (creme, pó, supositórios, comprimidos e soluções).

Líquidos iônicos doravante denominados de LIs são sais no estado líquido a temperaturas de até 100 °C, que apresentam tipicamente volatilidade negligenciável. Inicialmente, LIs foram aplicados como substitutos de solventes voláteis convencionais, transformando processos perigosos em recicláveis e ambientalmente amigáveis (Wasserschied, P. & Welton, T. *Ionic Liquids in Synthesis*, ed. VCH Wiley, Weinheim, 2nd Ed. (2008)). Mais tarde, o foco de aplicação foi amplamente expandido com, por exemplo, seu uso como eletrólito em baterias e em preparação de nanomateriais (Lu, J., Yan, F. & Texter, J. *Prog. Polym. Sci.* 34, 431 (2009)). Especialmente, a classe de LIs com cátions imidazólicos encontra aplicações de uma ampla variedade de processos e materiais, principalmente devido ao fácil ajuste de propriedades por mudanças estruturais em ambos cátion e ânion (Wasserschied, P. & Welton, T. *Ionic Liquids in Synthesis*, ed. VCH Wiley, Weinheim, 2nd Ed. (2008); Lu, J., Yan, F. & Texter, J. *Prog. Polym. Sci.* 34, 431 (2009)).

Estudos sobre a atividade biológica de LIs imidazólicos é relativamente escassa e a maioria destes estudos é focado nas propriedades antibacterianas contra espécies padrão de teste (Swatloski, R.P., Holbrey, J.D., Memon, S.B., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A. & Rogers, R.D. *Chem. Commun.* 668 (2004); Pernak, J., Sobaszekiewicz, K. & Mirska, I. *Green Chem.* 5, 52 (2003); Petkovic, M. et. al. *Green Chem.* 11, 889 (2009); Frade, R.F.M. & Afonso, C.A.M. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 1038 (2010)). Vários estudos relatam que as propriedades físico-químicas únicas dos LIs, especialmente a não volatilidade, a resistência térmica e química, além de sua estrutura auto-associativa, são atrativas para

várias aplicações farmacêuticas, principalmente como agentes antibacterianos (Ferraz, R., Branco, L.C., Prudêncio, C., Noronha, J.P. & Petrovski, Z. ChemMedChem. 6, 975 (2011)). Agentes antissépticos catiônicos, por exemplo, normalmente apresentam valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 8-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Demberelnyamba, D. et al. Bioorg. Med. Chem. 12, 853 (2004)). Dentro deste contexto, Hough-Troutman *et al.* apresentaram LIs com valores de CIM., contra bactérias de interesse clínico, entre 4-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Hough-Troutman, W.L. et al. New J. Chem. 33, 26 (2009)). Em contraste, poucos dados relacionando a atividade antifúngica de LIs e sua toxicidade em humanos são disponíveis. Como várias drogas antifúngicas atuais possuem efeitos colaterais indesejados e são ineficientes contra um grande número de leveduras patogênicas emergentes, existe uma necessidade urgente pela prospecção de novos agente antifúngicos (Thompson III, G.R., Cadena, J. & Patterson, T.F. Clin. Chest. Med. 30, 203 (2009)).

Descrição e sumário da invenção

Esta invenção descreve a avaliação da atividade antifúngica de um conjunto de sais metilimidazólicos *N*-substituídos, incluindo os *N*-substituintes - $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 3, 5, 9, 13, 15$), $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ ($n = 1, 3$), $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ ($n = 1, 3$), e os ânions Cl^- , BF_4^- , $(\text{F}_3\text{CSO}_2)_2\text{N}^-$, H_3CSO_3^- , PF_6^- , sobre isolados clínicos de leveduras patógenos emergentes. Os sais *N*-alquilimidazólio com $n = 9, 13$ ou 15 mostraram, independentemente do ânion, atividade inibidora contra diferentes isolados de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Trichosporon asahii*.

O sal imidazólico de cloreto de 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio mostrou a maior atividade inibitória contra todos os isolados com concentração inibitória mínima de $0,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, independentemente do tipo de isolado. Visando a utilização segura destas seis substâncias bioativas nos seres humanos, os testes *in vitro* genotóxicos foram realizados com células leucocitárias através da aplicação das concentrações inibitórias mínimas do sal imidazólico.

Em todos os casos, nenhum efeito genotóxico devido a danos no DNA em células de leucócitos humanos foi observado. Em geral, foram identificados sais imidazólicos mostrando atividade consideravelmente maior e toxicidade menor do que antifúngicos atualmente no mercado e, como consequência, essa classe pode ser considerada como uma droga potencial para o tratamento de agentes patogênicos de leveduras emergentes.

Descrição detalhada da invenção

Esta patente descreve um grupo de LIs, os quais se efetuou a varredura de um grupo de sais imidazólicos (Figura 1) em atividade antifúngica *in vitro* contra espécies de leveduras emergentes. Os sais de metilimidazol N-substituídos, incluindo os N-substituintes $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 3, 5, 9, 13, 15$); $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ ($n = 1, 3$); $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ ($n = 1, 3$); e os ânions Cl^- , BF_4^- , $(\text{F}_3\text{CSO}_2)_2\text{N}^-$, H_3CSO_3^- , PF_6^- (Figura 1); foram sintetizados como previamente reportado (Schrekker, H.S. et. al. J. Braz. Chem. Soc. 19, 426 (2008); Cassol, C.C., Ebeling, G., Ferrera, B. & Dupont, J. Adv. Synth. Catal. 348, 243 (2006) e testados contra 32 isolados clínicos de infecções nosocomiais por leveduras. Além disso, seus riscos potenciais de toxicidade em células leucocitárias

humanas foram avaliados para se obter um melhor entendimento de seu potencial de uso como uma droga.

Exclusivamente os sais imidazólicos substituídos com cadeias N-alquil com $n = 9, 13, 15$ mostraram, independente do ânion, atividade inibitória em concentrações de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra isolados de *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *Trichosporon asahii*. A Concentração Inibitória Mínima, doravante chamada apenas de CIM, destes LIs contra 8 isolados de cada espécie foi determinada. De modo geral, os valores de concentração inibitória mínima dos LIs variaram entre $0,9\text{-}250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tab. 1).

O LI. $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ apresentou, em geral, a melhor ação antifúngica entre os LIs identificados como ativos, apresentando a maior ação inibitória contra todos os isolados (CIM. de $0,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$), independente do tipo de isolado. Este valor é muito menor que os valores de CIM. de drogas comerciais usuais, fluconazol e cetoconazol, testados contra os mesmos isolados (Tab. 1). Estes resultados são de extrema importância, já que todos os isolados testados no ensaio de susceptibilidade aos antifúngicos são fortes formadores de biofilme.

A habilidade de formar biofilme é substancialmente associada à capacidade das leveduras patogênicas de causar infecções. Esta formação de biofilme promove resistência às drogas antifúngicas e resulta em proteção contra as defesas imunológicas do hospedeiro, causando consequências sérias e de difícil tratamento (Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J.C. & Ruiz-Baca, E. Future Microbiol. 7, 755 (2012)).

Agentes antifúngicos imidazólicos agem através da inibição da enzima lanosterol 14 α -demetilase e, devido à semelhança estrutural entre o imidazol e os compostos imidazólicos, o potencial do LI. C₁₆MImCl em danificar a membrana das células de leveduras emergentes pela inibição da biossíntese do ergosterol foi avaliado. O conteúdo total de ergosterol foi determinado para cada isolado cultivado, aplicando uma concentração de LI. sub inibitória (0,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Arthington-Skaggs, B.A., Jradi, H., Desai, T., Morrison, C.J. J. Clin. Microbiol. 37, 3332 (1999)). A redução porcentual na quantidade total de ergosterol celular para isolados clínicos sensíveis, comparado à quantidade em células controle cultivadas sem tratamento antifúngico, variou entre 33-89% por célula cultivada. Baseado nestes resultados pode ser concluído que este sal imidazólico inibe a enzima lanosterol 14 α -demetilase e afeta o ciclo de biossíntese do ergosterol. Curiosamente, esta redução parcial na quantidade do ergosterol induzido pelo LI. C₁₆MImCl em concentração sub-CIM abre a possibilidade de uso deste LI. em combinação com agentes antifúngicos disponíveis comercialmente, como uma estratégia de sinergismo entre drogas, incluindo antifúngicos que agem como inibidores de biossíntese de esteróis. Santos *et al.* (2012) relataram sobre as interações antagonísticas entre fluconazol (FLU) e anfotericina B (AmpB) em concentrações CIM (Santos, J. R. A., Gouveia, L. F., Taylor, E. L. S., Resende-Stoianoff, M. A., Pianetti, G. A., César, I. C., Santos, D. A., *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2553 (2012)). O Fluconazol reduz os sítios de ligação disponíveis para a ação da Anfotericina B devido a sua forte ação inibitória da biossíntese do ergosterol em níveis de CIM.

Assim, podemos concluir que os LIs são candidatos promissores para o tratamento de infecções por leveduras resistentes, seja como um componente único ou em combinação com, por exemplo, azóis.

Tabela 1. A susceptibilidade *in vitro* das leveduras patogênicas emergentes frente aos líquidos iônicos imidazólicos e aos agentes antifúngicos azólicos.

Leveduras patogênicas	Faixa de CIM / CIM 50 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)						Cetoconazol	Fluconazol
	C ₁₀ MIm Cl	C ₁₆ MIm Cl	C ₁₆ MIm PF ₆	C ₁₀ MIm MeS	C ₁₆ MIm BF ₄	C ₁₄ MIm NTf ₂		
<i>Trichosporon asahii</i>	7.8-62.5 /31.2	0.9-0.9 /0.9	15.6-62.5 /15.6	31.2-125 /62.5	1.95-15.6 /3.9	31.2-125 /62.5	0.25-16 /4	4-8 /8
<i>Candida parapsilosis</i>	1.9-15.6 /7.8	0.9-0.9 /0.9	0.9-31.2 /7.8	1.9-62.5 /7.8	0.4-15.6 /3.9	0.9-0.9 /0.9	0.125-16 /1	1-128 /1
<i>Candida tropicalis</i>	0.9-31.2 /1.9	0.9-0.9 /0.9	0.9-3.9 /1.9	1.9-125 /1.9	0.9-0.9 /0.9	0.9-250 /0.9	0.25-16 /4	2-128 /8
<i>Candida glabrata</i>	7.8-31.2 /15.6	0.9-0.9 /0.9	1.9-7.8 /3.9	15.6-250 /31.2	0.9-0.9 /0.9	3.9-125 /15.6	0.5-32 /4	4-128 /8

CIM., concentração inibitória mínima; CIM 50, CIM. que inibe 50% dos isolados testados.

Baseado nos resultados e na estrutura molecular dos LIs ativos, um mecanismo de inibição em duas etapas é proposto. Na primeira etapa o LI precisa permear a membrana da célula fúngica, onde o caminho reacional de síntese do ergosterol ocorre. Isso explicaria a permeabilidade exclusiva dos LIs com cadeia alquílica longa, os quais possuem estruturas anfífilas semelhantes a da bicamada fosfolipídica da membrana celular. A segunda etapa é responsável pelo efeito de inibição da rota sintética do ergosterol.

A atividade de remoção e inibição do biofilme leveduriforme sobre cateteres (como corpo de prova) foi observada em testes com isolados clínicos multirresistentes de *Candida tropicalis* (72A, 72P, 94P, 102A, 17P, RL18, RL17, RL16). Células de biofilme foram removidas com apenas 45 segundos de exposição do corpo de prova contaminado ao sal imidazólico C₁₆MImCl. A

observada, após o mergulho do corpo de prova no sal imidazólico durante 45 segundos. A capacidade de remoção e inibição da formação do biofilme fúngico leveduriforme teve melhor performance do que o antifúngico triazólico fluconazol, fármaco de referência no tratamento de leveduroses.

5 Visando o uso seguro dos LIs bioativos em humanos, testes genotóxicos *in vitro* com células leucocitárias humanas foram realizados pela aplicação da Concentração Inibitória Mínima do sal imidazólico. Glóbulos brancos são os tipos de células mais comumente testadas em ensaio cometa alcalino (Montagner, G.F.F.S. et al. *Toxicol. in Vitro* 24, 1410 (2010); Tice, R.R. et al. 10 *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206 (2000); Hartmann, A. et al. *Mutagenesis* 18, 45 (2003); Nadin, S., Vargas-Roig, L. & Ciocca, D. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1183 (2001)). Este é um método amplamente utilizado para detectar quebras lineares como danos iniciais das moléculas de DNA, já que este é um procedimento rápido e sensível para detectar genotoxicidade preliminar em 15 células de mamíferos, assim como biomonitoramento humano (Cortés-Gutiérrez, E.I. et al. *J. Histochem. & Cytochem.* 59, 655 (2011); Moller, P. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 1 (2005); Moller, P. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98, 336 (2006); Kawaguchi, S. et al. *J. Nuclei Acids* 2010, 1 (2010)). Os sais imidazólicos testados não mostraram nenhum dano detectável de DNA 20 nas concentrações utilizadas, em ensaio de eletroforese em gel de célula única. Então, sob estas condições, os LIs foram incapazes de induzir a quebra na estrutura de DNA. De modo semelhante, os LIs mostraram um grau de viabilidade celular próximo ao dos encontrados para as amostras de controle

negativo e DMSO (Mischell, B.B. & Siingi, S.M. Selected methods in cellular immunology (W.H. Freeman Company, San Francisco, 1980)). Estes resultados demonstraram que os Lis são incapazes, sob as condições aplicadas, de induzir dano à membrana em células leucocitárias humanas. Além disso, os resultados do ensaio de viabilidade celular confirmam os resultados obtidos pelo ensaio cometa, já que uma elevada porcentagem de viabilidade celular é necessária para realizar este ensaio (Collins, A.R. et al. Mutag. 23, 143 (2008)). De modo geral, considerando as condições experimentais aplicadas, nenhum efeito genotóxico devido a danos na estrutura da membrana celular e DNA de células leucocitárias humanas foi observado. Consequentemente, esta classe de Lis pode ser considerada como potencial para drogas no tratamento contra leveduras patogênicas emergentes.

Para concluir, os Lis identificados apresentam atividade consideravelmente maior e menor toxicidade que antifúngicos comumente utilizados. Isto mostra que estes sais metilimidazólicos N-substituídos são promissoras drogas, não tóxicas, contra leveduras emergentes e representam uma importante alternativa às terapias com antifúngicos azólicos para o tratamento e prevenção de candideszes e tricosporsis.

MÉTODOS

Sais Imidazólicos

Os Lis C_4MImBF_4 , $C_4MImNTf_2$, C_4MImPF_6 , $C_6MImMeS$, $C_{10}MImMeS$, $C_{14}MImNTf_2$, $C_{16}MImBF_4$, $C_{16}MImPF_6$, $C_3OMImMeS$ e $C_7O_3MImMeS$ foram sintetizados através de método livre de haletos. Os Lis $C_{10}MImCl$, $C_{16}MImCl$,

$\text{CH}_2\text{COOHImCl}$ e $\text{C}_3\text{H}_6\text{COOHImCl}$ foram sintetizados utilizando precursores halogenados. Todos os métodos são descritos na literatura e os dados espectrais dos produtos obtidos estão de acordo com os relatados no estado da técnica.

5 **ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME FÚNGICO**

Avaliação da atividade antifúngica in vitro

Um total de 32 isolados clínicos de leveduras patogênicas e oportunistas distribuídas em quatro espécies foi submetido aos testes de susceptibilidade antifúngica: *Trichosporon asahii* (TAH05, TAH09, TAH10, TAHA15, TAHA16, 10 TAHARL40, TAHARL46, TBL23), *Candida parapsilosis* (RL11, RL01, RL05, RL07, RL13, RL20, RL27 e RL32), *C. glabrata* (RL 02, RL03, RL09, RL12, RL25, RL26, RL34 e RL35) e *C. tropicalis* (72A, 72P, 94P, 102A, 17P, RL18, RL17, RL16). Os isolados utilizados nesta invenção são todos oriundos de 15 casos clínicos de leveduroses incluindo infecções sistêmicas, respiratórias e do trato urinário, tanto em pacientes HIV positivos como em imunocompetentes. Todos os isolados estão depositados na Micoteca da Faculdade de Farmácia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A concentração inibitória mínima (CIM) dos Lis contra as leveduras emergentes foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, de 20 acordo com o documento M27-A3 da CLSI 2008 (Clinical Laboratory and Standards Institute, 2008), utilizando o meio RPMI-MOPS (RPMI 1640 contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich – tamponado para pH 7.0 com 0.165 mol.L^{-1} de MOPS – Sigma). A concentração dos Lis foi

testada na faixa de 1,9-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e uma alíquota de 100 μL das culturas foram transferidas para os poços das microplacas de titulação. A CIM foi definida como a menor concentração dos sais imidazólicos na qual não houve crescimento visível do isolados leveduriformes. Os antifúngicos comerciais fluconazol e cetoconazol foram utilizados como controles positivos e negativos nos ensaios realizados. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada através do subcultivo de 10 microlitros de cada poço em placas contendo ágar sabouraud e incubados a 32 °C por 3 dias. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de matar o microrganismo. Os valores do CIM50 foram também determinados, através da concentração fungistática do LI. que inibe 50% dos isolados.

Quantificação da ação inibitória sobre a membrana celular fúngica

Com a finalidade de avaliar a capacidade de inibição da biossíntese do esterol de membrana pelo LI. mais efetivo ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$) nos ensaios de determinação da CIM, o esterol presente na membrana celular fúngica foi extraído como previamente relatado, determinando assim a presença do ergosterol e do ergosterol intermediário 24(28)-DHE [24(28)-deidroergosterol]. A redução do ergosterol detectável nos extratos de levedura indica a ação do LI. sobre a biossíntese desse esterol de membrana.

Para a análise, uma alíquota de 20 μL do extrato de esterol de membrana foi diluído 5 vezes em Etanol anidro e varrido espectrofotometricamente entre 240 e 300 nm. O conteúdo do ergosterol foi

calculado como a percentagem do peso do pellet da célula fúngica através das seguintes equações: % ergosterol + % 24(28)DHE = $[(A_{281.5}/290) \cdot F]$ / peso do pellet, % 24(28)DHE = $[(A_{230}/518) \cdot F]$ /peso do pellet, e a % ergosterol = $[\% \text{ergosterol} + \% 24(28)\text{DHE}] - \% 24(28)\text{DHE}$, em que F é o fator de diluição em etanol e 290 e 518 são valores (em % por cm^2) determinados para o ergosterol e 24(28)DHE cristalino, respectivamente.

Avaliação da capacidade de remoção do biofilme leveduriforme pelos líquidos iônicos nos corpos de prova

Corpos de provas (materiais policarbonados como cateteres) foram imersos em solução contendo cada sal imidazólico, separadamente. Após o tempo de 45, 60 e 90 segundos, respectivamente, os corpos de prova foram retirados da solução e foram imersos em um recipiente com 50 mL de água peptonada estéril, aplicando-se ultrassom a fim de desprender as células fracamente aderidas à superfície do corpo de prova. Diluições decimais seriadas foram aplicadas em cada amostra sonicada, sendo que 20 μL das mesmas foram semeadas em meio Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (Oxoid®), pelo método da gota. As placas foram incubadas a 32 °C, por 24 h, para a contagem das UFC/ cm^2 (Unidades Formadoras de Colônia por centímetro quadrado) a fim de quantificação da atividade de remoção do biofilme formado. A diferença da quantidade de células removidas entre solução teste e solução controle representou a capacidade de remoção do biofilme.

Avaliação da atividade antibiofilme dos sais imidazólicos nos corpos de prova

Cada tipo de corpo de prova foi previamente imerso nas soluções teste, separadamente, durante 45, 60 e 90 segundos. Para controle, um corpo de prova de cada material, será imerso apenas em água peptonada a 0,1%. Após a exposição, os corpos de prova serão retirados das soluções antifúngicas e submetidos à prova de formação do biofilme, em erlenmeyer contendo a solução das células leveduriformes na concentração em UFC/mL de infecção. A ausência de células de biofilme, ou a presença de quantidade de células inferior a densidade celular encontrada no corpo de prova não tratado caracterizou a eficácia da atividade antibiofilme (ou inibidora da formação do biofilme fúngico).

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CELULAR

Coleta de amostra de sangue

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa, utilizando seringas (BD Diagnostics, Plymouth, UK) e tubos com heparina. Subsequentemente, os leucócitos foram isolados e uma suspensão foi ajustada para se obter 8×10^3 células/mm³. Desta suspensão leucocitária, foi retirada uma alíquota que foi, posteriormente incubada com diferentes Lis por uma hora, sendo: C₁₀MImCl ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$), C₁₆MImCl ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), C₁₆MImPF₆ ($35 \mu\text{g mL}^{-1}$), C₁₀MImMeS ($65 \mu\text{g mL}^{-1}$), C₁₆MImBF₄ ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$), e C₁₄MImNTf₂ ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, uma alíquota de cada amostra foi utilizada para realizar o ensaio cometa e a análise de inviabilidade celular. Para as concentrações utilizadas nos ensaios de toxicidade foram levados em consideração os resultados obtidos no ensaio de atividade antifúngica (MIC).

Eletroforese em gel de célula única (ensaio cometa)

O ensaio cometa alcalino foi aplicado como descrito na literatura de acordo com as orientações gerais para uso do ensaio cometa, que foi realizado em triplicata para cada concentração de LI. testada. Cada amostra foi analisada em duplicata (duas lâminas com cem células cada) e dois indivíduos diferentes avaliaram cada lâmina. As células foram pontuadas visualmente de acordo com o comprimento da cauda e receberam pontuações entre 0 (sem migração) e 4 (migração máxima). Assim, o índice de danos para as células variou de 0 (todas as células sem migração) a 400 (todas as células com migração máxima).

Ensaio de Inviabilidade celular

O ensaio de inviabilidade celular foi realizado utilizando células expostas às mesmas concentrações de LIs testadas no ensaio cometa. Após a incubação, 100 mL de uma suspensão de células leucocitárias foram homogeneizadas por 3 min. com 100 mL de uma solução 0.2% de Trypan Blue em tampão de fosfato. A inviabilidade celular foi determinada microscopicamente (aumento de 400x) e duas categorias de células foram pontuadas: (1) células vivas incolores ou azul claro; e (2) células mortas de cor azul. Um mínimo de 300 células foi contado para cada determinação de sobrevivência.

Descrição detalhada das figuras

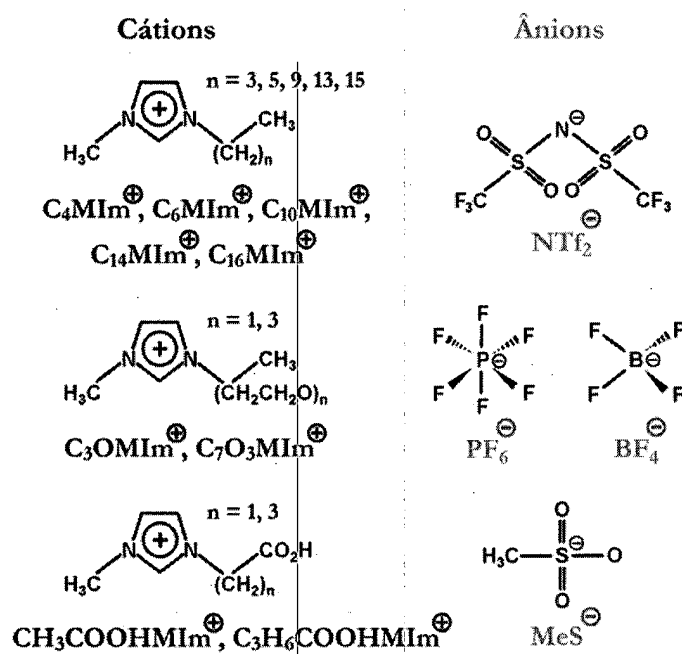
Figura 1: Sais imidazólicos com atividade antifúngica

Reivindicações

- 1) USO DE SAIS IMIDAZÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES PATOGÊNICOS E MULTIRRESISTENTES **caracterizado** pelo grupo de sais de metilimidazol N-substituídos, incluindo os N-substituintes $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 3, 5, 9, 13, 15$); $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ ($n = 1, 3$); $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ ($n = 1, 3$); e os ânions Cl^- , BF_4^- , $(\text{F}_3\text{CSO}_2)_2\text{N}^-$, H_3CSO_3^- , PF_6^- poderem ser utilizados como antifúngicos.
- 2) USO DE SAIS IMIDAZÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES PATOGÊNICOS E MULTIRRESISTENTES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelos referidos sais de metilimidazol N-substituídos serem utilizados preferencialmente contra células planctônicas (infecciosas) e de biofilme oriundas dos fungos leveduriformes *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *Trichosporon asahii*, todos multirresistentes aos antifúngicos utilizados na clínica médica.

Figuras

5

Figura 1:

Resumo**USO DE SAIS IMIDAZÓLICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME SOBRE FUNGOS LEVEDURIFORMES PATOGÊNICOS E MULTIRRESISTENTES.**

A presente invenção descreve um grupo de substâncias sintéticas atóxicas com ação antifúngica, com capacidade de remoção do biofilme leveduriforme, bem como ação preventiva de sua formação (atividade antibiofilme). Esse relatório descreve a aplicação dos sais imidazólicos, alvo da invenção, contra fungos leveduriformes patogênicos ao homem e aos animais endotérmicos (sangue quente), assim como sua aplicação sobre células fúngicas com capacidade de adesão sobre superfícies policarbonadas, denominadas de células de biofilme. Os sais imidazólicos podem ser utilizados como substâncias removedoras ou inibidoras da formação de biofilme, conservantes de produtos de uso farmacêutico, cosmético ou alimentício (como aditivo alimentar) ou diretamente como droga antifúngica terapêutica, por possuir atividade biológica equivalente a fármacos antifúngicos de referência para estrutura molecular proposta nas drogas sintéticas alvo desta invenção.