



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

(21) **PI 0713792-3 A2**

(22) Data de Depósito: 27/06/2007  
(43) Data da Publicação: 06/11/2012  
(RPI 2183)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/53

(54) **Título:** USO DE DERIVADOS DE ESTILBENO PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE INFECCÕES POR FUNGOS AQUÁTICOS

(30) **Prioridade Unionista:** 27/06/2006 US 60/816.619

(73) **Titular(es):** Hadasit Medical Research Services & Development Limited, State Of Israel, Ministry Of Agriculture & Rural Development, Agricultural Research Organization

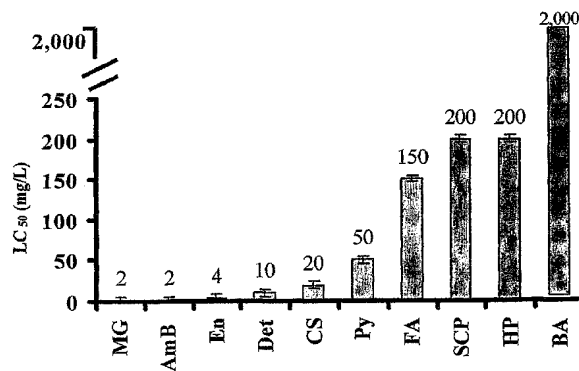
(72) **Inventor(es):** Itzhack Polacheck, Rama Falk , Simon Tinman

(74) **Procurador(es):** Ricardo Pinho

(86) **Pedido Internacional:** PCT IL2007000784 de 27/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/001368de 03/01/2008

(57) **Resumo:** USO DE DERIVADOS DE ESTILBENO PARA O TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE INFECCÕES POR FUNGOS AQUÁTICOS. A invenção refere-se aos método de tratamento e prevenção de infecções por fungos quáticos em organismos aquáticos e métodos de desinfetar equipamento empregado em organismos aquáticos aumentado. Os método compreendendo o uso de um ou mais derivado de estilbeno, incluindo derivados de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico.



## “USO DE DERIVADOS DE ESTILBENO PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE INFECÇÕES POR FUNGOS AQUÁTICOS”

### Campo da Invenção

5 A invenção refere-se a composições de derivados de estilbeno úteis em métodos de tratamento e prevenção de infecções por fungos aquáticos tal como peixes e ovas de peixe.

### Antecedente da Invenção

Oomicetos (fungos de água) tal como *Saprolegnia*, *Branchiomyces* e *Aphanomyces* são responsáveis por infecções devastadoras de peixe em aquacultura, tanques e viveiros de peixe de passatempo.

10 Os membros do gênero *Saprolegnia* causam saprolegniose, uma doença que é caracterizada por branco visível ou emplastos cinzentos de micélio filamentososo no corpo ou barbatanas de peixe de água doce. Se não tratado, infecção com espécies de *Saprolegnia* (*spp.*) leva a morte através de haemodiluição. *Saprolegnia spp.* também infecta ovas de peixe por adesão a e penetração da membrana do ovo. *Saprolegnia spp.* são considerados  
15 patógenos oportunistas que são saprofitos. A infecção frequentemente ocorre durante o inverno, frequentemente resultando em grande escala epidemias “matança de inverno”. As condições que promovem proliferação de *Saprolegnia spp.* e seus zoosporos infecciosos incluem diminuições abruptas em temperaturas da água e atividades de viveiro de densidade elevada, e também parece fazer peixe vulnerável para infecção devido a tensão fisiológica  
20 aumentada e supressão de sistema imune.

*Saprolegnia parasitica* é um dos patógenos de peixe danificando economicamente, causando perdas de milhões de dólares anualmente por todo mundo, particularmente nos mercados de salmão e truta. Além de ser um patógeno oportunístico, algumas linhagens de *S. parasitica* são altamente virulentas e causa infecções primárias.

25 Branchiomicose é outra infecção ocorrendo em peixe de água doce, principalmente em carpa e enguia. É causado por *Branchiomyces sanguinis* e *B. demigrans*, com necrose de guelra de peixe proeminente de mostra de peixe afetado e angústia respiratória. A doença mais comum ocorre em lagos com matéria orgânica abundante, e níveis de amônia elevados.

30 As infecções parasitárias são frequentemente simultâneas com ou acompanhado por infecções de oomiceto em determinados viveiros comerciais. Tais infecções parasitárias incluem esses causados por *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina spp.*, *Dactylogyrus Spp.* e *Gyrodactylus spp.*

35 Os oomicetos, incluem *Saprolegnia spp.* e *Branchiomyces spp.* são microorganismos de eucariótico filamentosos que têm muitas características tipo fungos, porém não são fungos verdadeiros. Como os fungos verdadeiros, eles alimentam em matéria deteriorando e crescem como filamentos ramificados com hifa não septado. Entretanto, sua parede celular

não é composta de quitina (como nos fungos verdadeiros) porém é composto de uma mistura de compostos de celulósica e outro  $\beta$ -glucans. Além disso, oomicetos têm várias fases desenvolvendo claramente definidas que não são encontradas em fungos. Os estudos moleculares recentes tem mostrado entretanto, que rigorosamente relacionado a componentes de virulência são compartilhados entre oomicetos e fungos.

Os métodos das técnicas anteriores para tratamento de infecções de oomiceto patogênicas, incluindo saprolegniose e branchiomycose sofre várias desvantagens. As substâncias químicas Diquat (um herbicida), cloreto de benzalcônio, sulfato de cobre e permanganato de potássio tem sido todas descritas para ser útil para tratamento de branchiomycose. Nenhum destes entretanto, são aprovados pela U.S. Food e Drug Administration para controle de doença em alimento de peixe.

US 6,160,023 descreve uso de bronopol (2-bromo-nitropropano-1,3-diol) para tratamento e profilaxia de infecções de *S. parasitica* em peixe, e para equipamento desinfetado empregado em aumento de peixe. Este composto é principalmente efetiva contra presente de infecção em ovas de peixe, porém não que ocorrendo em peixe. Além disso, é relativamente tóxico a espécies de peixe comercialmente importantes.

Malachite verde (4 - [(4-dimetilaminofenil)-fenil-metil] - N,N-dimetil-anilina) foi previamente amplamente empregado para controlar saprolegniose. Ao mesmo tempo em que esta tintura orgânica é muito eficiente em *S. parasitica* morta<sup>1</sup>, seu uso foi proibido desde 2002 ao redor do mundo, devido a suas propriedades carcinogênicas, teratogênicas e toxicológicas. Isto tem resultado em um aumento dramático de infecções de *Saprolegnia* em colocações comerciais. Portanto, há uma necessidade urgente por métodos de alternativa modernos de administração de saprolegniose.

Os métodos são também conhecidos para controlar infecções parasitárias em peixe. US 5,464,837 e US 5,188,832 descreve uso compostos de dionade triazina; US 5,313,911 descreve uso de peróxido de hidrogênio; US 6,054,454 descreve uso de derivados de oxadiazina; US 6,982,285 descreve uso de derivado de benzoiluréia; US 6,117,457 descreve uso de ácido de peracético; US 5,593,678 descreve uso de sais de ortovanadato; US 5,504,081 descreve uso de derivado de nitrometileno. Nenhum destes métodos são conhecidos para ser útil para controle simultâneo de oomiceto e infecções parasitárias.

Derivado de Estilbeno, incluindo derivado de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico, são agentes de clareamento fluorescentes conhecidos que liga-se a polissacarídeos tendo ligações de  $\beta$ -glicosídico, incluindo celulose e quitina. Tais compostos mostram atividade antifúngica, presumivelmente devido à interação com e interrupção de microfibrilas de quitina que constitui um elemento estrutural principal na parede celular fúngica (Roncero e outros (1985) J. Bacteriol. 163:1180-1185). Os efeitos antifúngicos de clareadores fluorescente têm sido demonstrados em fungos verdadeiros que

contêm quitina em suas paredes celular, incluindo fungos patogênicos de planta (Seppanen e outros (2004) Plant Cell. Rep. 22:584-593), fungos patogênicos humano como leveduras (Roncero e outros (1988) J. Bacteriol. 170:1950-54), dermatofitos (Inamori e outros (1985) Chem. Pharm. Bull. (Tóquio) 33:2904-9) e alga vermelha (Belliveau e outros (1990) Stain Technol. 65:303-311), porém não em modos aquáticos que contêm celulose em vez de quitina nas suas paredes celular.

US 4,723,034 descreve derivado de estilbeno de 2-vinil útil como fungicidas para proteção de planta e preservação de madeira.

US 5,359,131 e US 5,852,015 descrevem derivados de estilbeno tendo efeitos antiviróticos.

US 5,879,674 descreve métodos de semeia planta protegida de ataque de inseto empregando-se derivado de estilbeno para induzir infecções viróticas epizoóticas.

US 6,919,452 e publicação de pedido de patente US No. 2005/0230662 descrevem derivados de ácidos 4,4'-bis(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico e seu uso como agentes de clreamento fluorescentes.

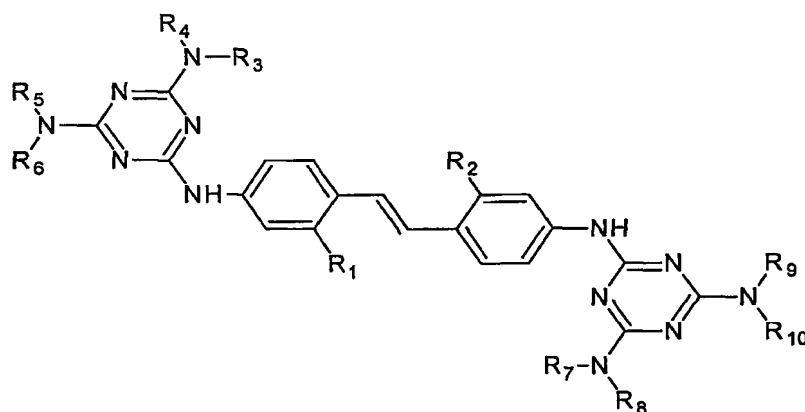
Em parte alguma na técnica anterior é ensinada ou sugerida que derivados de estilbeno podem ser empregados para tratar infecções de modo aquático.

#### Sumário da Invenção

A presente invenção fornece métodos que são efetivos em prevenção e tratamento de infecções de oomiceto em organismos aquáticos. Vantajosamente, os métodos da invenção envolvem uso de composições compreendendo compostos conhecidos que têm efeitos tóxicos desprezíveis e são aceitáveis para uso até mesmo em espécies aquáticas pretendido para consumo humano. Em particular, a presente invenção fornece métodos novos empregando derivados de estilbeno para tratamento e prevenção de infecções de oomiceto. A invenção é baseada, em parte, na descoberta inesperada que derivados de estilbeno, incluindo derivados de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico, são efetivos para prevenção e tratamento de infecções de oomiceto, tal como saprolegniose, que ocorre em organismos aquáticos incluindo peixes e ovas de peixe. O método da invenção é efetivo para aplicação em ambas uma fase inicial de infecção, quando nenhum sinal clínico pode ser evidente, bem como nas fases posteriores de infecção quando infecção é estabelecida. Sem desejar ser ligado por qualquer teoria particular ou mecanismo de ação, esta atividade pode ser devido à capacidade de tais compostos para interferir com síntese de parede celular em oomicetos.

De acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um método de prevenir ou tratar uma infecção de oomiceto em um organismo aquático, o método compreendendo a etapa de contactar o organismo aquático com uma quantidade efetiva de pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico da Fór-

mula (I):



Fórmula (I)

Onde  $R_1$  e  $R_2$  são os mesmos ou diferentes e são cada independentemente selecionado do grupo consistindo em  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $\text{SO}_3\text{K}$ ,  $\text{SO}_3\text{NH}_4$  e  $\text{H}$ ; e onde  $R_3$  a  $R_{10}$  são os mesmos ou diferentes e são selecionados do grupo consistindo em  $\text{H}$ ;  $\text{C}_1\text{-C}_6$  alquila linear ou ramificada;  $\text{C}_2\text{-C}_6$  alquenila linear ou se ramificada, onde a referida alquila ou alquenila são cada independentemente não substituído ou substituída com um grupo hidroxila, carboxila, ou carboxamida; fenila; e fenila substituída com  $R_1$  ou  $R_2$  onde  $R_1$  e  $R_2$  são como definido acima; ou um ou mais de  $R_3$  e  $R_4$ ,  $R_5$  e  $R_6$ ,  $R_7$  e  $R_8$  ou  $R_9$  e  $R_{10}$ , junto com o nitrogênio para o qual eles são ligados, formam um anel heterocíclico que pode também compreende um ou mais heteroátomos adicional selecionado de  $\text{N}$ ,  $\text{O}$  e  $\text{S}$ ; e sais, hidrato, solvatos e polimorfos destes.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção fornece um método de equipamento desinfetado empregado para aumenta para um organismo aquático, onde o equipamento é contaminado com um oomiceto, o método compreende a etapa de contata o equipamento com uma quantidade efetiva de pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico da Fórmula (I).

Em particular modalidade dos métodos da invenção, dois ou mais de  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_7$  e  $R_8$  são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  e  $\text{H}$ ; ou um ou mais de  $R_3$  e  $R_4$ ,  $R_7$  e  $R_8$  junto com o nitrogênio para o qual eles são ligados, forma um anel de morfolinila. Em outras modalidades, dois ou mais de  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_9$  e  $R_{10}$  são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em fenila e fenila substituída com  $\text{SO}_3\text{Na}$ . Em outras modalidades,  $R_1$  e  $R_2$  são os mesmos e são selecionados de  $\text{SO}_3\text{H}$  e  $\text{SO}_3\text{Na}$ . Ainda em outras modalidades,  $R_1$  e  $R_2$  são diferentes e são selecionados de  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $\text{SO}_3\text{K}$ ,  $\text{SO}_3\text{NH}_4$  e  $\text{H}$ .

Em modalidades específicas dos métodos da invenção, o derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é selecionado de ácido 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis)2-hidroxi-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfônico;

4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfonato de dissódico;

4,4'-bis-(6-anilino-4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfonato de sódio de potássio;

5 ácido 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-(4-anilino-6-((2-hidroxietil)metilamino)-s-triazin-2-il)amino)-, sal de dissódico;

dissódico 4,4'-bis[[4-anilino-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)amino]estilbeno-2,2'-dissulfonato;

10 tetrasódio 4,4'-bis[[4-[bis(2-hidroxietil)amino]-6-(4-sulfonatoanilino)-1,3,5-triazin-2-il]amino] estilbeno-2,2'-dissulfonato;

tetrasódio 4,4'-bis[[4-[bis(2-hidroxipropil)amino]-6-[(4-sulfonatofenil)amino]-1,3,5-triazin-2-il]amino]-estilbeno-2,2'-dissulfonato;

e ácido 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-[[4-[(2-carbamóil)etil(2-hidroxietil)amino]-6-(p-sulfoanilino)-s-triazin-2-il]amino]-, sal de tetrasódio.

15 Em modalidades específicas dos métodos da invenção, o oomiceto é selecionado de *Saprolegnia spp.*, *Aphanomyces spp.* e *Branchiomyces spp.* Em uma modalidade mais específica, o oomiceto é *Saprolegnia parasitica*.

20 Em modalidades específicas dos métodos da invenção, o pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é fornecido como uma solução. Em outras modalidades específicas, o pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico está presente na solução em uma concentração de cerca de 20 a cerca de 200 mg/L. De acordo com as modalidades preferidas, o pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico está presente na solução em uma concentração de cerca de 25 mg/L.

25 Em modalidades específicas dos métodos da invenção, o organismo aquático é selecionado de peixe, ovos de peixe e molusco. Em modalidades específicas, os peixes são selecionados de perca-gigante, baixo, brema, carpa, bagre, *chub*, enguia, enguia jovem, linguado, dourado, peixe de aquário, linguado gigante, carpa chinesa, *labrax*, tainha, peixe-espatula, linguado europeu, pompom, peixe vermelho, *red-drum*, salmão, sola, esturjão, tilápia, truta, atum e baleia branca.

30 Em modalidades específicas dos métodos da invenção, a etapa contatada é durante um período de cerca de 2 a cerca de 16 horas. Em modalidades preferidas, o passo contatando é durante um período de cerca de 8 horas. Em outras modalidades, a etapa contatada é repetida em intervalos de 48 hora.

35 Em uma modalidade do método de prevenir ou tratar uma infecção de oomiceto em um organismo aquático, a infecção de oomiceto é simultânea com ou acompanhado por uma infecção parasitária. Em outra modalidade, a infecção parasitária é causada por pelo

menos um parasita selecionado do grupo consistindo em *Amyloodinium spp.*, *Argulus Spp.*, *Ascocotyle Spp.*, *Bothricephalus Spp.*, *Camallanus Spp.*, *Capilaria Spp.*, *Centrocestus Spp.*, *Chilodonella Spp.*, *Coccidia Spp.*, *Contraecum Spp.*, *Cryptobia Spp.*, *Cryptocaryon Spp.*, *Dactylogyrus Spp.*, *Dermocystidium Spp.*, *Ergasilus Spp.*, *Euclinostomum Spp.*, *Gyrodactylus Spp.*, *Hexamita Spp.*, *Ichtyobodo Spp.*, *Ichtyophthirius Spp.*, *Lernaea Spp.*, *Metacercarius Spp.*, *Microsporidia Spp.*, *Myxosporea Spp.*, *Oodinium Spp.*, *Sanguinicola Spp.*, *Sessiline Spp.*, *Spironucleus Spp.*, *Tetrahymena Spp.*, *Trichodina Spp.*, *Trichodinella Spp.* e *Tripartiel-la spp.*

Em uma modalidade do método de equipamento desinfetado empregado para au-  
mentar um organismo aquático, o equipamento é também contaminado com pelo menos um  
parasita. Em outra modalidade, o pelo menos um parasita é selecionado do grupo consistin-  
do em *Amyloodinium spp.*, *Argulus Spp.*, *Ascocotyle Spp.*, *Bothricephalus Spp.*, *Camallanus Spp.*, *Capilaria Spp.*, *Centrocestus Spp.*, *Chilodonella Spp.*, *Coccidia Spp.*, *Contraecum Spp.*, *Cryptobia Spp.*, *Cryptocaryon Spp.*, *Dactylogyrus Spp.*, *Dermocystidium Spp.*, *Ergasi-  
lus Spp.*, *Euclinostomum Spp.*, *Gyrodactylus Spp.*, *Hexamita Spp.*, *Ichtyobodo Spp.*, *Ichtyo-  
phthirius Spp.*, *Lernaea Spp.*, *Metacercarius Spp.*, *Microsporidia Spp.*, *Myxosporea Spp.*, *Oo-  
dinium Spp.*, *Sanguinicola Spp.*, *Sessiline Spp.*, *Spironucleus Spp.*, *Tetrahymena Spp.*, *Tri-  
chodina Spp.*, *Trichodinella Spp.* e *Tripartiella spp.*

Será entendido explicitamente que o escopo da presente invenção abrange varian-  
tes de derivado de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico, tal como  
sais, hidrato, solvatos e polimorfos destes, como são conhecido na técnica, com a estipula-  
ção que estes variantes deve preservar a capacidade para prevenir e tratar infecções de  
oomiceto em organismos aquáticos no contexto da presente invenção.

Outros objetos, características e vantagens da presente invenção desse modo fica-  
rá claro na descrição seguinte e desenhos. Entretanto, deveria ser entendido que a descri-  
ção detalhada e exemplos específicos, ao mesmo tempo em que indicando modalidades  
preferidas da invenção, são determinados por via de ilustração somente, desde então várias  
alterações e modificações dentro do espírito e escopo da invenção ficará aparente para al-  
guém versado na técnica desta descrição detalhada.

#### Breve Descrição das Figuras

Figura 1 ilustra a toxicidade de vários compostos em peixe de tilápia. MG, Malachite  
Green; AmB, formulações de Amphotericin B; En, enilconazole; Det, detergentes e desinfe-  
tantes; CS, sulfato de cobre; Py, Pyceze®; FA, formaldeído; SPC, percarbonato de sódio; o  
HP, peróxido de hidrogênio; BA, Blankophor® BA.

Figura 2 ilustra a eficácia terapêutica de Blankophor® BA (compreendendo sódio de  
potássio 4,4'-bis-(6-anilino-4-bis(2-hidroxi)etil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-  
dissulfonato) e Malachite Green (4-[(4-dimetilaminofenil)-fenila-metil]-N,N-dimetil-anilina) em

um sistema modelo de infecção inicial tilápia-saprolegniose. Os peixes tilápia foram tratados com Blankophor<sup>®</sup> BA 100 mg / L (♦) ou 200 mg/L (●), ou com Malachite Green 0,25 mg/ L (▲) nos 2º, 4º e 6º dia após exposição para *Saprolegnia*. Controle, (■).

Figura 3 ilustra a eficácia terapêutica de Blankophor<sup>®</sup> BA, formaldeído e Malachite Green em um sistema modelo de infecção inicial de tilápia-saprolegniose. Os peixes tilápia foram tratados com Blankophor<sup>®</sup> BA 25 mg / L (▲) ou 50 mg/L (♦), Malachite Green 0,25 mg / L (□) ou formaldeído 50 mg/L (●) nos 2º, 4º e 6º dia após exposição para *Saprolegnia*. Em experiências adicionais, peixes tilápia foram tratados com Blankophor<sup>®</sup> BA 50 mg/L nos 2º e 9º dia após exposição (Δ), ou 100 mg/ L nos 2º dia após exposição (◇). Controle, (■).

Figura 4 ilustra a eficácia terapêutica de Blankophor<sup>®</sup> BA, em um sistema modelo estabelecendo tilápia-saprolegniose. Os peixes Tilápia foram tratados com Blankophor<sup>®</sup> BA 100 mg/ L (Δ), 50 mg/L (o) ou 25 mg/L (▲) nos 3º e 8º dia após exposição para *Saprolegnia*. Controle, (♦).

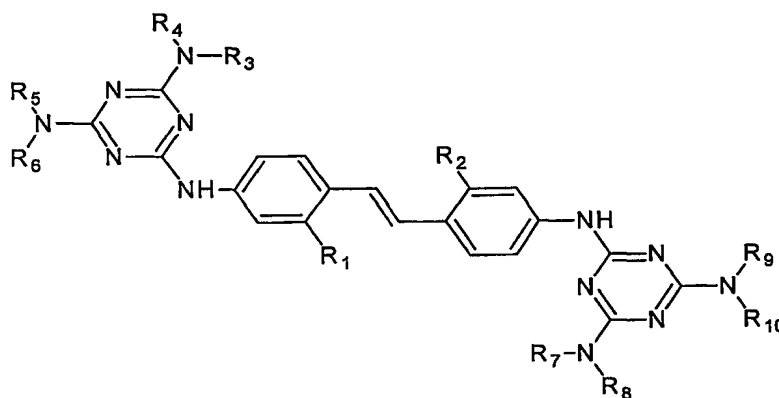
Figura 5 mostra varredura microscopia de elétron de paredes celular de *Saprolegnia* tratados com (painel A) e sem (painel B) Blankophor<sup>®</sup> BA. Ampliação: 3000x.

Figura 6 ilustra o efeito de exposição a Blankophor<sup>®</sup> BA (100 mg/L) (□) em atividade de fotosintético em culturas puras de *Chlorella* (C), *Microcystis* (M), *Peridinium* (P) e *Melosira* (I), e em amostras de Lake Kinneret (LK), como determinado por <sup>14</sup>C-captação. Controle, (■).

#### Descrição Detalhada da Invenção

De acordo com a presente invenção, são fornecidos métodos para prevenção e tratamento de infecções de oomiceto que ocorre em organismos aquáticos incluindo peixes e ovos de peixe, e métodos de equipamento desinfetado empregado para aumentar organismos aquáticos, onde o equipamento é contaminado com um oomiceto.

Os métodos da invenção compreende uma etapa de contatar ou o organismo aquático, ou o equipamento empregado para aumentar o organismo aquático, com uma quantidade efetiva de pelo menos um derivado de estilbeno, particularmente um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico da Fórmula (I):



## Fórmula (I)

Na Fórmula I, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são os mesmos ou diferentes e são cada independentemente selecionado do grupo consistindo em SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub>Na, SO<sub>3</sub>K, SO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> e H. Além disso na Fórmula I, R<sub>3</sub> a R<sub>10</sub> são os mesmos ou diferentes, e R<sub>3</sub> a R<sub>10</sub> são selecionados do grupo consistindo em H; C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila linear ou ramificada; C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquenila linear ou se ramificada, onde a referida alquila ou alquenila são cada independentemente não substituída ou substituída com um grupo hidroxila, carboxila, ou carboxamida; fenila; e fenila substituída com R<sub>1</sub> ou R<sub>2</sub> onde R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são como definido acima; ou, um ou mais de R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> ou R<sub>9</sub> e R<sub>10</sub>, junto com o nitrogênio para o qual eles são ligados, formar um anel heterocíclico que pode também compreende um ou mais heteroátomos adicional selecionado N, O e S.

Em particular modalidades dos métodos da invenção, dois ou mais de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> e H; ou um ou mais de R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> junto com o nitrogênio para o qual eles são ligados, forma um anel de morfolinila.

Em outras modalidades, dois ou mais de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>9</sub> e R<sub>10</sub> são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em fenila e fenila substituída com SO<sub>3</sub>Na. Em outras modalidades, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> o mesmo e são selecionado de SO<sub>3</sub>H e SO<sub>3</sub>Na. Ainda em outras modalidades, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são diferentes e são selecionados de SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub>Na, SO<sub>3</sub>K, SO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> e H.

Exemplos de derivado de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico útil na invenção incluir, porém não são limitados a ácido 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis)2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfônico; dissódico 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis)2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfonato; sódio de potássio 4,4'-bis-(6-anilino-4-bis)2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfonato; ácido 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-(4-anilino-6-((2-hidroxietil)metilamino)-s-triazin-2-il)amino) -, sal de dissódico; dissódico 4,4'-bis[(4-anilino-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)amino]estilbeno-2,2'-dissulfonato; tetrasódio 4,4'-bis[[4-[bis(2-hidroxietil)amino]-6-(4-sulfonatoanilino)-1,3,5-triazin-2-il]amino]estilbeno-2,2'-dissulfonato; tetrasódio 4,4'-bis[[4-[bis(2-hidroxipropil)amino]-6-[(4-sulfonatoanilino)-1,3,5-triazin-2-il]amino]-estilbeno-2,2'-dissulfonato; e ácido 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-[[4-[(2-carbamioetil)(2-hidroxietil)amino]-6-(p-sulfoanilino)-s-triazin-2-il]amino]-, sal de tetrasódio.

Quando os compostos descritos acima incluem um ou mais centros de quiral, o estereoquímico de tais centros de quiral pode ser independentemente na configuração de R ou S, ou uma mistura dos dois. Os centros de quiral podem ser também designados como R ou S ou R,S ou d,D, l,L ou d,1, D,L.

## Definições

O termo "C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> alquila" como empregado aqui refere-se a radicais saturados tal como metil, etil, n-propil, isopropil, n-butil, iso-butil, sec-butil, terc-butil, amil, terc-amil, hexil e

outros. Os grupos  $C_1$  a  $C_6$  alquila preferido são metil, etil e propil. Os grupos  $C_1$  a  $C_6$  alquila são independentemente opcionalmente substituídos com um grupo hidroxil, carboxila ou carboxamida. Os substituintes preferidos são hidroxila e grupos de carboxamida. Os grupos de  $C_1$  a  $C_6$  alquil substituído exemplar são hidroxietil, hidroxipropil e etilcarboxamido. Em modalidades específicas do derivado ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico da invenção, cada um de  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  e  $R_8$  são hidroxietil. Em outras modalidades específicas, dois de  $R_5$  ou  $R_6$ , e  $R_7$  ou  $R_8$  são hidroxietil e dois são o H. Ainda em outras modalidades, cada de  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  e  $R_8$  são hidroxipropil. Ainda em outras modalidades, dois de  $R_5$  ou  $R_6$ , e  $R_7$  ou  $R_8$  são etilcarboxamido e dois são hidroxietil.

O termo " $C_2$  a  $C_6$  alquenila" como empregado aqui refere-se a radicais não saturados tal como radicais de vinil, alila, 2-butenil, 3-butenil, 2-pentenil, 3-pentenil, 4-pentenil, 2-hexenil, 3-hexenil, 4-hexenil, 5-hexenil ligados em qualquer posição de carbono apropriada e outros, bem como dienos e trienos de cadeia linear ou ramificada. Os grupos  $C_1$  a  $C_6$  alquenila são opcionalmente substituídos com grupos de hidroxila, carboxila, ou carboxamida.

O derivado de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico podem ser opcionalmente substituídos em qualquer um ou mais de  $R_3$  a  $R_{10}$  com grupo fenila ou com grupos de fenila substituídos com  $R_1$  ou  $R_2$ , onde  $R_1$  e  $R_2$  são definidos acima. Em modalidades específicas, dois de  $R_3$  ou  $R_4$ , e  $R_9$  ou  $R_{10}$  são fenila e dois são H.

O termo "fenila substituída com  $R_1$  ou  $R_2$ " como empregado aqui se refere a um grupo de fenila substituído com um ou mais porções selecionado do grupo consistindo em  $SO_3H$ ,  $SO_3Na$ ,  $SO_3K$ ,  $SO_3NH_4$  e H. Em modalidades específicas, dois de  $R_3$  ou  $R_4$ , e  $R_9$  ou  $R_{10}$  são fenila substituídas com  $SO_3Na$  e dois são H.

O termo "anel heterocíclico que pode também compreende um ou mais heteroátomos selecionado de N, O e S" como empregado aqui se refere à anéis opcionalmente de cinco membros a oito membros substituídos que podem ter 1 a 4 heteroátomos, tal como nitrogênio, enxofre e/ou oxigênio, em particular oxigênio, junto com um átomo de anel de nitrogênio. Estes anéis de cinco membros a oito membros podem ser saturados, completamente não saturado, parcialmente não saturado ou aromático, com anéis completamente saturados sendo preferidos. Os anéis heterocíclicos de acordo com a invenção incluir, porém não são limitados a, morfolino, piperidinil, piperazinil, imidazolil, 2-amino-imidazoil, pirrolo, heptilametilenoimino, tiazol, triazol, pirrolidina de tetrazol, pirazol, imidazol, piridina, tio-morfolina, oxazol e pirimidina.

O termo "quantidade efetiva" como empregado aqui se refere a uma quantidade de pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico da invenção que é efetivo a trata, prevenir, proteger, reparar, desintoxicar ou desinfetar um organismo aquático contra uma infecção de oomiceto ou para tratar, prevenir, proteger, reparar, desintoxicar ou desinfetar equipamento contra contaminação de oomiceto, em contato

com pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico durante algum período de tempo.

Derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno dissulfônico-2,2'- dissulfônico

5 Os derivados de ácido util 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico para os métodos da presente invenção incluem agentes de branqueamento conhecidos nos quais foram empregados no têxtil, detergente e indústrias de papel. Tais compostos são geralmente conhecidos como C.I. Clareadores Fluorescente (tendo vários sufixos numéricos), e inclui, por exemplo, C.I. Clareador 28 Fluorescente, C.I. Clareador 113 Fluorescente, 10 C.I. Clareador 28/113 Fluorescente, C.I. Clareador 220 Fluorescente, C.I. Clareador 235 Fluorescente, C.I. Clareador 260 Fluorescente e C.I. Clareador 263 Fluorescente. C.I. Clareadores fluorescente possuem uma estrutura molecular de cadeia principal comum, e difere com respeito aos substituintes ligado a qualquer ou ambos anéis de benzeno e triazina, e com respeito à natureza do derivado de ácido ou sal. Além disso, C.I. Clareadores Fluorescente são vendidos sob várias marcas comerciais e um composto pode ter vários sinônimos 15 diferentes. Por exemplo, dissódico 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfonato é conhecido pelo nome comum C.I. Clareador 28 Fluorescente e foi vendido sob as marcas comerciais Calcofluor® White, Cellufluor® e Phorwite®, entre outros. C.I. Clareadores fluorescente são fornecido como solução aquosa ou formulações de pó. Por exemplo, Blankophore® BA Liquid (Lanxess) é uma solução aquosa compreendendo a mistura de sal de sódio de potássio 4,4'-bis-(6-anilino-4-bis(2- 20 hidroxietil)amino)-1,3,5-triazin-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfonato.

Outros derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico são também pretendido, e pode ser criado alterando-se os substituintes ligados a qualquer 25 ou ambos anéis de benzeno e triazina, e/ou o derivado de sal. Eles podem estar na forma de sais, sais misturados, ácidos livres e misturas destes. Tais derivados podem ser facilmente designados e sintetizados por aquele versado na técnica.

Os derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico útil para os métodos da presente invenção pode ser fornecida em várias formulações, por exemplo, soluções aquosas, ou formulações de pó que são reconstituídas com água. As formulações aquosas podem conter agentes que auxilia em solubilidade. As formulações de pó podem conter agentes dispersantes ou agentes de remoção de pó. Tais excipientes devem ser apreciavelmente solúveis em água e não devem ser tóxico a organismos vivos e o ambiente. 30

Os derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico útil para os métodos da presente invenção são apreciavelmente solúvel em água. A solubilidade de água pode em geral, seja aumentado aumentando-se os números de substituintes hidró- 35

filos tal como grupos de sulfonato e hidroxila, como é conhecido por alguém versado na técnica.

Os derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico útil para os métodos da presente invenção são estáveis a hidrólise, porém pode ser sujeito a fotodegradação na hidrosfera, devido a ter absorção UV máximos entre 340 a 360 nm em água. Eles podem ou não podem ser facilmente biodegradável; no caso posterior, eles são preferivelmente absorvidos sobre barro em sistemas de tratamento de água residual.

Os derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico útil para os métodos da presente invenção tem impacto mínimo em criaturas vivas e no ambiente. Por exemplo, a segurança relativa global de C.I Clareadores 28 Fluorescente, 220, 235, 260 e 263 foram documentados. Estes compostos são relatados a ter baixa toxicidade a peixe, anelídeos e bactérias e baixa toxicidade moderada a invertebrados aquáticos e algas. Com respeito a mamíferos, eles têm dose aguda baixa ou repetida toxicidade oral, não são mutagênico ou clastogênico, não são toxicantes reprodutivos ou desenvolventes, e não são geralmente irritando ou sensibilizando para pele e olhos (*Stilbene Fluorescent Whitening Agents Category*, submetida à Agencia de Proteção da do ambiente US pelo Forte tarefa do Agente de Branqueamento Fluorescente ETAD, em 6 de outubro de 2005).

#### Mecanismo putativo de ação

Sem desejar ser ligado a qualquer teoria particular ou mecanismo de ação, a eficácia terapêutica e profiláctica dos derivados de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico da invenção contra oomicetos podem ser atribuídos a capacidade de tais compostos para romper paredes celular de oomiceto.

Vários derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico são conhecidos para ligar a polissacarídeos tendo ligações de  $\beta$ -glicosídico, tal como ocorre em celulose (a  $\beta$ -(1,4) polímero ligado de unidades de D-glicose). As paredes celulares oomiceto em geral, contem celulose e outros polímeros  $\beta$ -glucan, por exemplo,  $\beta$ -(1,2) ligado e ( $\beta$ -(1,6) polímeros ligado de unidades de D-glicose, como os elementos estruturais principais. Ao mesmo tempo em que as proporções e ligado destes polímeros varias entre gêneros de oomiceto diferentes e espécies, estes macromoléculas são os alvos prováveis dos derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico da invenção. A inserção de tais compostos com compromisso de polímero  $\beta$ -glicosídico nascente e/ou formado completamente a integridade da parede celular, ultimamente principal a lise celular.

O mecanismo de ação pode ser similar ou análogo a isso exercido pelos derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico contra fungos verdadeiros em qual quitina (a  $\beta$ -(1,4) polímero ligado de unidades de N-acetil-D-glicosamina) é o componente estrutural principal de paredes celular.

#### Patógenos de Oomiceto e doenças de organismos aquáticos

Os métodos da invenção são efetivos contra doença causando oomicetos que atacam organismos aquáticos, incluindo peixe e molusco. Os oomicetos incluem, porém não são limitados a *Achyla spp.*, *Aphanomyces spp.*, *Branchiomyces spp.*, *Brevilegnia Spp.*, *Dermocystidium Spp.*, *Dictyuchus Spp.*, *Ichthyophonous Spp.*, *Isoachyla Spp.*, *Leptolegnia Spp.*, *Leptomitus Spp.*, *Protoachyla Spp.*, *Pythium Spp.*, *Saprolegnia spp.*, e *Thraustotheca spp.*

Os organismos do gênero *Saprolegnia*, e especialmente *S. parasitica*, são responsável por saprolegniose, uma das infecções de oomiceto mais comuns e significantes que ocorre em peixe. Em comum com todo o oomicetos de saprofílico, *Saprolegnia spp.* alimentos segregando-se a enzimas de degradante sobre a superfície para a qual é ligado, desse modo permitindo absorção de nutrientes tal como proteínas e carboidrato. Saprolegniose freqüentemente ocorre como uma infecção secundária seguinte dano para o integumento de peixe (pele e brânquias) causado por parasitas, vírus, infecções bacterianas e abrasão. Outros fatores predispondo incluem superpopulação, manipulação intensiva e poluição de água. Menos comum, *Saprolegnia spp.* pode agir como uma infecção patógeno primário de peixe que não tem causado dano de integumento. Tais ataques são dependentes de temperatura, normalmente ocorre em baixas temperaturas, possivelmente como uma consequência de uma resposta imune reduzida. Bem como sendo uma ameaça para peixe, *Saprolegnia spp.* também infeta ovos de peixe.

Saprolegniose aparece como emplastos cinza/branco na pele ou brânquias que se parece a moita de lã de algodão. Em uma fase posterior eles podem ficar marrons ou verdes como eles capturam sedimento ou algas. Se o peixe é removido da água, o fungo aparece como uma massa de material viscoso. *Saprolegnia spp.* normalmente estabelece como infecções pequenas, focais que então dispersar rapidamente sob o corpo ou brânquias. Como dispersar, tecido saudável é destruído. Freqüentemente inflamação pequena a menos que uma infecção bacteriana fundamental. O exame microscópico mostra amplo, hifae não separado, típico de oomietes.

*Achyla Spp.* causa uma doença similar a saprolegniose, e sob condições similar.

Branchiomicose ou "doença parasitária de brânquia" é causada por *Branchiomyces sanguinis* e *B. demigrans*. As ambas espécies são encontradas em sofrimento de peixe de tensão ambiental, tal como pH inferior, oxigênio dissolvido inferior, flor de algas elevada ou níveis de amônia elevados. Os peixes afetados se aparecem letárgicos e as brânquias são estriadas ou marmóreas com as áreas pálidas representam tecido infetado e agonizante.

As infecções de oomiceto são transmitidas entre peixe por zoosporos infeccioso que são libertados de tecidos infetados.

#### Organismos aquáticos

De acordo com a invenção, o método de prevenir ou tratar uma infecção de oomice-

to pode ser aplicado a uma variedade ampla de organismos aquáticos que são infetados com ou em risco de infecção através de patógenos de oomiceto. Os organismos aquáticos incluem, porém não são limitados a peixe e ovas. Os peixes incluem peixe economicamente útil elevado em colocações de viveiro de peixe comercial, peixes cultivado, peixes de aquá-  
 5 rio e peixes decorativos de todas as idades que vivem livre em água doce e água do mar. Os peixes incluem porém não são limitados perca-gigante, baixo, brema, carpa, bagre, *chub*, enguia, enguia jovem, linguado, dourado, peixe de aquário, linguado gigante, carpa chinesa, *labrax*, tainha, peixe-espatula, linguado europeu, pompom, peixe vermelho, *red-drum*, salmão, sola, esturjão, tilápia, truta, atum e baleia branca. Os organismos aquáticos  
 10 também incluir, porém não são limitados a molusco, moluscos e crustáceos, por exemplo, molusco comestível, mexilhão, caranguejo, *geoduck*, mexilhão, lagosta, ostra, camarão, camarão e ouriço do mar.

#### Equipamento empregado para elevar organismos aquáticos

De acordo com a invenção, o método de equipamento desinfetado empregado para  
 15 elevar organismos aquáticos estar voltado a equipamento que é empregado para conter, elevar, manipular e tratar os organismos aquáticos, por exemplo, peixe. A descrição de doença de oomiceto nos organismos aquáticos é um indicador suficiente que o equipamento é contaminado, ou por contato direto com os organismos aquáticos infetados abrigando micélio de hifa ou por contato com o zoosporos dispersado. Tal equipamento requer desinfecção,  
 20 para eliminar a possibilidade de infecção recorrente, por exemplo, em peixe maduro que tem uma doença de oomiceto e foi tratado de acordo com a invenção, ou infecção nova em peixes jovens ou ovas introduzidas ou expostas ao equipamento. O equipamento inclui aquários, bacias, banhos, gaiolas, filtros, malhas, redes, lagoas, piscinas, tanques, aparelho de transferência, cubas, termômetros e outros.

#### Infecções parasitárias

As infecções parasitárias são freqüentemente simultâneas com ou acompanham infecções de oomiceto, por exemplo, em colocações de viveiro comerciais e em aquários de passatempo. Os peixes sujeitaram para tensão e/ou condições ambientais adversas podem ser vulneráveis a tais infecções simultâneas devido a supressão de sistema imune. As infecções parasitárias incluem essas causas por *Amyloodinium spp.*, *Argulus spp.*, *Ascocotyle spp.*, *Bothricephalus spp.*, *Camallanus spp.*, *Capilaria spp.*, *Centrocestus spp.*, *Chilodonella spp.*, *Coccidia spp.*, *Contracaecum spp.*, *Cryptobia spp.*, *Cryptocaryon spp.*, *Dactylogyrus spp.*, *Dermocystidium spp.*, *Ergasilus spp.*, *Euclinostomum spp.*, *Gyrodactylus spp.*, *Hexamita spp.*, *Ichtyobodo spp.*, *Ichtyophthirius spp.*, *Lernaea spp.*, *Metacercarius spp.*, *Microsporidia spp.*, *Myxosporea spp.*, *Oodinium spp.*, *Sanguinicola spp.*, *Sessiline spp.*, *Spironucleus spp.*,  
 35 *Tetrahymena spp.*, *Trichodina spp.*, *Trichodinella spp.* e *Tripartiella spp.*

Os inventores da presente invenção tem surpreendentemente encontrado aquele

tratamento com pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico de acordo com a invenção é efetivo para tratar pelo menos uma infecção parasitária que é simultâneo com uma infecção de oomiceto em peixe.

#### Aplicações da invenção

5 O método de prevenir ou tratar uma infecção de oomiceto descrito aqui pode ser aplicado em uma variedade de situações, incluindo: (1) prevenção profilática de erupções de doença periódica em colocações de viveiro comercial; (2) intervenção e tratamento terapêutico de peixe infetado; (3) tratamento após condições de tensão antecipadas, por exemplo alterações em qualidade de água incluindo diminuição de temperatura; (4) pré-tratamento e  
10 tratamento após transferir e/ou transporta peixe; (5) tratamento de peixe "doente" para pasatempo de casa; e (6) manutenção de saúde em peixe para escala pequena e grande, crescimento doméstico e comercial e para experiências científicas. O método da invenção é efetivo para aplicação em ambos uma fase inicial de infecção, quando nenhum sinal clínico pode ser aparente, bem como em fases posteriores de infecção quando a infecção de oomiceto é estabelecida e causas uma taxa elevada de mortalidade.  
15

Por prevenir ou tratar uma infecção de oomiceto, organismos aquáticos são contatados com uma quantidade efetiva de pelo menos um derivado ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico. A etapa contatando pode ser realizada transferindo-se organismos aquáticos, por exemplo, peixe ou molusco em uma colocação comercial,  
20 da sua facilidade de retenção original, por exemplo, uma lagoa ou tanque, para uma facilidade de retenção fresca contendo uma quantidade efetiva de pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico. Este método é preferível quando infecção de oomiceto foi descrita, por exemplo, nos corpos de peixe, requerendo intervenção apropriada e tratamento terapêutico. Para tal tratamento terapêutico, a densidade de  
25 peixe na facilidade de retenção fresca pode ser mantida à mesma relação como na facilidade de retenção original, ou pode ser preferivelmente diminuído para aliviar condições de tensão.

Alternadamente, os organismos podem ser mantidos na facilidade de retenção original, para qual é adicionado uma quantidade efetiva de pelo menos um derivado de ácido  
30 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico. Este método pode ser preferido por razões econômicas quando o método da invenção é aplicado para prevenção de infecção de oomiceto, ou como um procedimento de rotina ou em antecipação de condições de tensão esperadas.

Nos métodos descritos aqui para prevenir ou tratar uma infecção de oomiceto e para  
35 equipamento desinfetado, a etapa contatada é realizada com pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico que pode ser fornecido em uma variedade de formas. Uma solução é geralmente preferida, porém outras formas são tam-

bém pretendidas, por exemplo, comprimidos dissolvidos, géis, e materiais impregnados que libertam o material ativo em exposição a água, ou que são adequados para aplicação direta para equipamento contaminado.

Quando uma solução é empregada, uma concentração na faixa de cerca de 20 a  
5 cerca de 200 mg/litro de água podem ser adequadas para a maioria das aplicações. A concentração mais baixa que obtém eficácia de prevenção, terapêutica, ou desinfetada contra infecção de oomiceto ou contaminação é preferível, para minimizar custos e a quantidade de compostos libertados em sistemas de água residual. A concentração preferida pode também  
10 depender da duração do tratamento e na idade e condição dos organismos aquáticos tratados. Por exemplo, contatando peixe de tilápia com 25 mg/litro de Blankophor® BA durante 8 horas foi encontrado para ser efetivo para prevenir e tratar saprolegniose em peixe de tilápia.

Uma quantidade efetiva do pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é que obtém eficácia de prevenção (profilático),  
15 terapêutica, ou desinfetada, como apropriado. A quantidade efetiva pode ser determinada em experiências de piloto. Uma quantidade efetiva para prevenir infecção de oomiceto se refere à quantidade ou concentração induzida em contato com um organismo aquático tal que o organismo aquático é prevenido de ficar infetado na presença de um patógeno de oomiceto para qual o organismo aquático é suscetível. Por exemplo, um tratamento profilático é julgado a ser efetivo em uma situação onde a taxa de mortalidade devido ao desafio  
20 de patógeno de oomiceto em pré-tratamento de peixe com um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico após o desafio está reduzido por uma porcentagem significativa, por exemplo, 25 a 100%, da taxa observada em peixe não pré-tratamento. Uma quantidade efetiva para tratar uma infecção de oomiceto se refere à quantidade ou concentração induzida em contato com um organismo aquático infetado com um  
25 patógeno de oomiceto tal que o organismo aquático é protegido contra o desenvolvimento ou progressão de uma infecção, doença, ou mortalidade associado com o patógeno de oomiceto. Por exemplo, um tratamento terapêutico é julgado para ser efetivo em uma situação onde a taxa de mortalidade em peixe desafio primeiro com um patógeno de oomiceto e tratado subsequente-  
30 mente com um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é reduzido por uma porcentagem significativa, por exemplo, 25 a 100%, da taxa observada em peixe infetado, não tratado. Uma quantidade efetiva para equipamento desinfetado contaminado com um oomiceto se refere à quantidade ou concentração induzida em contato com o equipamento tal que o equipamento nenhum abrigo por mais tempo de micélio de oomiceto ou zoosporos. Por exemplo, um tratamento desinfetando é julgado a ser  
35 efetivo em uma situação onde o equipamento desinfetado é monitorado para a presença de micélio e/ou zoosporos de oomiceto após o tratamento desinfetado e encontrado para ser

reduzido por uma porcentagem significativa, por exemplo, 25 a 100%, observado antes do tratamento desinfetado.

Contatado de organismos aquático e/ou equipamento contaminado com pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico pode ser realizado durante um período de tempo de cerca de 2 horas a cerca de 16 horas. Por exemplo, um período de cerca de oito horas foi achado para ser encontrado para ser efetivo em peixe infetado. Se tempo é uma limitação, períodos relativamente mais curtos podem ser empregados, opcionalmente com concentrações mais elevadas de pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico. O tempo não é um fator limitando, períodos mais longos podem ser empregados e podem ser preferível para equipamento desinfetado. Além disso, os períodos de contato podem ser repetidos em intervalos regulares, por exemplo, 48 horas após conclusão do primeiro período de contato, assegurar erradicação completa da infecção de oomiceto ou contaminação.

A descrição precedente das modalidades específicas revelará completamente a natureza geral da invenção que outros podem, aplicando-se conhecimento atual, facilmente modificado e/ou adaptada para várias aplicações tais modalidades específicas sem experimentação imprópria e sem partir do conceito de marca, e, portanto, tais adaptações e modificações devem e são pretendidos a ser compreendido dentro do significado e faixa de equivalentes das modalidades descritas. Será entendido que a fraseologia ou terminologia empregada aqui para o propósito de descrição e não de limitação. Os meios, materiais, e etapas para realizar várias funções descritas podem levar uma variedade de formas alternativas sem partir da invenção.

Os exemplos seguintes são apresentados para ilustrar completamente certas modalidades da invenção. Eles devem de nenhuma maneira, entretanto, ser interpretado como limitando o escopo amplo da invenção. Alguém versado na técnica pode facilmente planeja muitas variações e modificação das descrições principal aqui sem partir do escopo da invenção.

#### Exemplos

##### Exemplo 1

A suscetibilidade *in vitro* de *Saprolegnia parasitica* T-I e *S. parasitica* CBS 540,67 para vários compostos foi determinado pela diluição de ágar e ambos métodos de macrodiluição.

#### Material e Métodos

##### *Saprolegnia parasitica* isolados

*Saprolegnia parasitica* T-I isolados foram obtidos de lesões de pele em tilápia moribundo exibindo sinais de saprolegniose. Para o propósito de isolamento, uma parte pequena da pele e escalas revestida com hifaefoi secada, e corte com uma lâmina de escalpelo esté-

ril, então colocada sobre placas de Glicose-Peptona- Penicilina-Estreptomicina (GP-PS) contendo 3 g/l glicose, 1 g/l peptona, micronutrientes de traço e 250 mg/l cada Penicilina-G e Sulfato de Estreptomicina, e incubado às 18°C.

Após a incubação durante 3-4 dias, um bloco de ágar da borda da colônia de fungo foi cortado e colocado em placa de Petri estéreis, contendo água destilada dupla e semente de Trevo estéril, para obter novas colônias de bactéria livre. A identificação molecular foi feita pelo Dr. Alexandra Riethmueller (University of Kassel, Alemanha) através de seqüenciamento das regiões ITS do 18S rDNA.

Os isolantes foram mantidos em 18°C em placas de GP-PS, e foram transferidos todos os meses.

*S. parasitica* CBS 540,67 é uma tensão disponível publicamente.

#### Reagentes

Os compostos testados para atividade contra *S. parasitica* são resumidos na Tabela 1.

#### Teste de suscetibilidade

Dois métodos foram empregados, cada adequado para uma fase diferente do ciclo de vida assexual de *Saprolegnia spp.*: i) os ambos método de macrodiluição, para determinação de suscetibilidade de zoosporos e cistos; e ii) o método de diluição de ágar para determinação de suscetibilidade de hifae filamentosos. Cada composto foi testado três vezes em cada método. Malachite Green foi empregado como controle positivo.

#### Ambos método de macrodiluição

Este método é uma modificação do método empregado para modos de acordo com EUCAST 7,1 (European Committee on antibiotic Susceptibility Testing) e CLSI/NCCLS M27-A2 (Clinical Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards). Para preparação de inóculo, *S. parasitica* isolado foram cultivados em GP-PS durante 7 dias com sementes de trevo estéreis às 18°C. As sementes de trevo (~20) revestido com micélio foram removidos e adicionados a 40 ml de RPMI-1640 ambos médio (Sigma; preparado de acordo com instruções de NCCLS) e incuado às 18°C durante 4-7 dias. Cistos e zoosporos livres de hifae foram coletados, e um inóculo de  $\sim 10^3$  CFU/ml como medido por contagem de hemocitômetro, foi preparado em RPMI. Soluções de matéria prima dos compostos testados foram preparados em água ou em DMSO, como indicado na Tabela 2. A solução de matéria prima do clareador 28 fluorescente foi preparado adicionando-se 40% KOH gradualmente a uma solução de 10 mg/ml em água, até for claro, então foi filtrado duas vezes através de um filtro estéril não pirogênico de 0,2  $\mu$ m (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha).

As diluições em série de duas vezes das soluções de matéria prima resultantes foram fixas em RPMI-1640 médio em um volume de 0,1 ml. As concentrações de droga final

nos tubos de teste variados  $1 \times 10^4$  a 0,01 mg/L. O inóculo de 0,9 ml foi adicionado a cada de um tubo estéril contendo 0,1 ml da droga diluída consecutivamente. Dois tubos contendo droga livre médio e dois tubos contendo inóculo de droga livre foram empregados como controles. Os tubos inoculados foram incubados em temperatura ambiente (15-20°C) durante 24 h. O crescimento em cada tubo foi então avaliado visualmente. O MIC-0 foi definido como a concentração mais baixa de droga que resulta em inibição completa de crescimento visível.

#### Método de diluição agar

Este método é uma modificação do método apresentada por Bailey (Bailey, T.A. (1983) Prog. Fish Cult. 45:24-27), e foi empregado para o teste de suscetibilidade de hifae de *Saprolegnia*. As diluições de de série de duas vezes foram preparadas em água estéril destilada dupla com concentrações de droga final variando de 10,000 a 0,01 mg/L em um volume final de 1,0 ml. Dissolvido (56°C) RPMI-1640 médio de ágar (Sigma) foi preparado de acordo com instruções de NCCLS, e então adicionado a cada tubo contendo droga ou controle de água. A mistura foi vortexado e despejado em placas pequenas. Após de solidificação de ágar um pedaço medido pequeno, levado de uma cultura 7-10 dia velha de *S. parasitica* T-I em médio de GP-PS foi colocado na parte superior em cada prato. As placas foram incubadas em temperatura ambiente (15-20°C) durante 24 h. O crescimento em cada placa foi então estimada visualmente, e os valores de MIC foram definidos como a concentração mínima que resulta em inibição completa de crescimento visível comparada a um controle de droga necessitada.

Tabela 1. Compostos de teste contra *S. parasitica*

| Compostos                                  | Fonte  |
|--|--|
| Malachite Green                            | Reactif R.A.L, Paris, France                 |
| Sulfato de cobre                           | Sigma, St. Louis, Mo., USA                   |
| Formaldeído                                | Sigma, St. Louis, Mo., USA                   |
| Clareado 28 fluorescente                   | Sigma, St. Louis, Mo., USA                   |
| Pyceze® (bronopol)                         | Novartis, Essex, UK                          |
| Blankophore® BA                            | Lanxess, Leverkusen, Germany                 |
| Peróxido de hidrogênio                     | Ecolab, Zohar Dália, Israel                  |
| Percarbonato de sódio                      | Ecolab, Zohar Dália, Israel                  |
| Clinador® (Enilconazol)                    | Dorvet, Nes Ziona, Israel                    |
| Anfotericina B                             | Dumex, Copenhagen, Denmark                   |
| Fungizone® (desoxicolato de anfotericina)  | Squibb, Middlessex, UK                       |
| Anfotericina B- arabinogalactana conjugado | Falk, R., Domb. A. J. & Polacheck, I. (1999) |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| (AmB-AG)                       | Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 1975-81 |
| C-TAB                          | BDH Chemicals, Poole, UK                          |
| Triton X-100                   | BDH Chemicals, Poole, UK                          |
| Tween <sup>®</sup> -20         | BDH Chemicals, Poole, UK                          |
| Tween <sup>®</sup> -80         | BDH Chemicals, Poole, UK                          |
| Dodecil sulfato de sódio (SDS) | BDH Chemicals, Poole, UK                          |
| Digitonin                      | Merck, Darmstadt, Germany                         |
| Carcid <sup>®</sup>            | Carmel Resins, Atlit, Israel                      |
| Carcil <sup>®</sup> C-50       | Carmel Resins, Atlit, Israel                      |
| Septocil <sup>®</sup>          | Carmel Resins, Atlit, Israel                      |
| Agrosept <sup>®</sup>          | Ketox, Copenhagen, Denmark                        |
| Oleo Neem                      | Tomer-teva, Israel                                |
| Saprofin <sup>®</sup>          | Dropco Laboratorios, Chile                        |
| NaCl                           | Sigma, St. Louis, Mo., USA                        |

### Resultados

Os dois métodos para determinar em suscetibilidade *in vitro* de *S. parasitica* foram altamente reproduzíveis (98 e 95% respectivamente). Os valores de MIC obtidos empregando os dois *S. parasitica* isolados foram similares para cada compostos testados, e a diferença entre então foi estatisticamente insignificante. Os valores de MIC dos compostos testados são apresentados na Tabela 2, com cada resultado representa a média geométrica de três testes independentes. Os valores de MIC mais baixos foram constantemente obtidos com Malachite Green (0,06 mg/L). Outros compostos que exibindo elevada atividade *in vitro* (MIC  $\leq 10$  mg/L) contra *S. parasitica* foram como segue: Clareador 28 Fluorescente, todos os detergentes catiônicos testados, Digitonin (um detergente não iônico), percarbonato de sódio e peróxido de hidrogênio. A atividade mais baixa foi descrito com óleos naturais, Tween-20 e cloreto de sódio (MIC  $\geq 200$  mg/L). A despeito da atividade *in vitro* elevada observada com Clareador 28 Fluorescente (valores de MIC de 1 e 5 mg/L em ambos métodos), foi eliminado de estudos subseqüentes em atividade *in vivo*, toxicidade e eficácia terapêutica, devido a seu custo extremamente elevado.

Tabela 2. Valores de MIC (mg/L) de vários compostos

| Composto | Solvente | S. parasítica T-1 |                  | S. parasítica CBS |                  |
|----------|----------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
|          |          | Macrodiluição     | Diluição de ágar | Macrodiluição     | Diluição de ágar |
|          |          |                   |                  | 540,67            |                  |

|                               |     |        |        |        |        |
|-------------------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| Antimicrobianos               |     |        |        |        |        |
| Malachite Green               | DDW | 0,06   | 0,06   | 0,06   | 0,06   |
| Percarbonato de sódio         | DDW | 5      | NA*    | 2,5    | NA     |
| Peróxido de hidrogênio        | DDW | 10     | NA     | 8      | NA     |
| Sulfato de cobre              | DDW | 40     | 80     | 80     | 120    |
| Formaldeído                   | DDW | 100    | 100    | 100    | 100    |
| Pyceze® (bronopol)            | DDW | 100    | 100    | 100    | 200    |
| Cloreto de sódio              | DDW | 30,000 | NA     | 30,000 | NA     |
| Agentes antifungos            |     |        |        |        |        |
| Fungizone®                    | DDW | 0,25   | 5      | 0,5    | 5      |
| Anfotericina B                | DDW | 0,5    | 5      | 0,25   | 2,5    |
| AmB-AG conjugado              | DDW | 0,5    | 5      | 0,25   | 5      |
| Enilconazol                   | DDW | 1      | 5      | 1      | 5      |
| Clareado fluorescente         |     |        |        |        |        |
| Clareado 28 fluores-<br>cente | DDW | 1      | 5      | 2      | 5      |
| Blankophore® BA               | DDW | 100    | 200    | 200    | 200    |
| Detergentes & disifetantes    |     |        |        |        |        |
| Carcid® (catiônico)           | DDW | 5      | 50     | 5      | 100    |
| Carcil® C-50 (catiônico)      | DDW | 5      | 50     | 5      | 50     |
| Septocil® (catiônico)         | DDW | 5      | 50     | 5      | 100    |
| CTAB (catiônico)              | DDW | 5      | 10     | 5      | 50     |
| Agrosept® (catiônico)         | DDW | 10     | 50     | 5      | 50     |
| Digitonin (não iônico)        | DDW | 2,5    | 10     | 2,5    | 20     |
| Triton X-100 (não iônico)     | DDW | 50     | 200    | 100    | 200    |
| Tween® 20 (não iônico)        | DDW | 500    | 1,000  | 250    | 1,000  |
| Tween® 80 (não iônico)        | DDW | 100    | 200    | 100    | 200    |
| SDS (aniônico)                | DDW | 100    | 500    | 250    | 500    |
| Óleo natural                  |     |        |        |        |        |
| Saprofin®                     | DDW | 400    | 400    | 400    | 400    |
| Óleo Neem                     | DDW | >1,000 | >1,000 | >1,000 | >1,000 |
| NA = não aplicável            |     |        |        |        |        |

## Exemplo 2

Teste de toxicidade em Tilápia

Os compostos avaliados no Exemplo 1 foram também avaliados para seus efeitos

tóxicos em peixe de tilápia.

#### Material e Métodos

Os valores de LC<sub>50</sub> foram determinados através de testes de curto prazo estáticos como uma medida da toxicidade letal aguda relativo para tilápia (*Standard methods for the evaluation of water and wastewater* (1985) 16<sup>o</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D. C. pág. 689-819).

Tilápia híbrido (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*) tendo um peso comum de 20 g, foi mantido em tanque de 100 litro de polietileno em uma densidade de 1 peixe por 10 litros, em uma temperatura constante de 21°C durante três semanas antes da iniciação da experiência por adição de um composto teste para cada tanque. As toxicidades de peróxido de hidrogênio, percarbonato de sódio e Blankophore<sup>®</sup> BA foram também avaliados em temperaturas de 18°C e 15°C. Para experiências posteriores, peixes foram aclimatado à temperatura requerida durante três semanas antes da adição do composto teste para o tanque. Os peixes foram tratados com 5 diferentes concentrações de cada composto teste, determinado de acordo com os valores de MIC de cada composto.

A mortalidade de peixe foi registrada até 96 h. A água parâmetro (O<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, pH e Cl<sup>-</sup>) foi monitorado ao longo da experiência e foram mantidos dentro dos limites aceitáveis. Os resultados apresentados são a média de duas experiências separadas.

Todos os procedimentos para cuidado e tratamento de peixe foram de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Hebrew University of Jerusalém, Israel) e foram aprovados pelo Committe for Ethical Conduct in the Care and Use of Laboratory Animals.

#### Resultados

Os valores de LC<sub>50</sub> determinados para várias compostos são apresentados na Figura 1. Os compostos tendo um valor de LC<sub>50</sub> de 5 a 10 vezes elevado mais do que seu respectivo MIC foram selecionado para estudo adicional para eficácia terapêutica no modelo de tilápia-saprolegniose.

Os valores de LC<sub>50</sub> de sulfato de cobre, Pyceze<sup>®</sup>, e todos os desinfetantes testados, detergentes e agentes antifungos foram inferiores, similares ou insignificamente diferentes dos valores de MIC respectivos e foram excluídos adequadamente do estudo de eficácia terapêutico. As diferenças elevadas significativamente foram demonstradas para Malachite Green, formaldeído, peróxido de hidrogênio, percarbonato de sódio, e Blankophore<sup>®</sup> BA isto é a relação entre o valor de LC<sub>50</sub> e o valor de MIC foi >20. Alguns dos compostos com baixa toxicidade às 18°C foram também testados a uma mais baixa temperatura (15°C). Os resultados são apresentados na Tabela 3 e claramente indicados que a toxicidade de peróxido de hidrogênio, e para uma maior extensão, percarbonato de sódio, aumentando significativamente às 15°C. Em contraste, o valor de LC<sub>50</sub> de Blankophor<sup>®</sup> BA permanece elevado, até

mesmo à mais baixa temperatura, indicando sua falta relativa de toxicidade pelo peixe.

Tabela 3. Toxicidade de compostos (LC<sub>50</sub>) em tilápia em várias temperaturas

| Composto               | LC <sub>50</sub> (mg/L) |        |        |
|------------------------|-------------------------|--------|--------|
|                        | 15°C                    | 18°C   | 25°C   |
| Peróxido de hidrogênio | 75                      | ≥100   | >100   |
| Percarbonato de sódio  | 27                      | >100   | >100   |
| Blankophor® BA         | >2,000                  | >2,000 | >2,000 |

### Exemplo 3

#### Teste de Toxicidade de Blankophor® BA Em Várias Espécies de Peixe

5

#### Materiais e Métodos

Os valores de LC<sub>50</sub> para Blankophor® BA em várias espécies de peixes foram determinados como no Exemplo 2, exceto que peixes foram aclimatados a 21°C durante três semanas, e então para 15°C durante outras duas semanas antes da iniciação da experiência. A aclimação seguinte a 15°C, Blankophor® BA (100, 200, 500, 1,000 ou 2,000 mg/L) foi adicionado aos tanques, e mortalidade de peixe foi registrada até 96 h. A água parâmetros (O<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, pH e Cl<sup>-</sup>) foram monitorados ao longo da experiência e foram mantidos dentro dos limites aceitáveis. Os resultados apresentados são a média de duas experiências separadas. Os peixes empregados foram: tilápia híbrido (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*), peso comum 20 g; tainha cinzenta (*Mugil cephalus*), peso comum 70 g; carpa comum (10 *Cyprinus carpio*), peso comum 25 g; robalo listrado híbrido (*Morone saxatilis* X *M. chrysops*), peso comum 25 g, e carpa de grama (*Ctenopharyngodon idella*), peso comum 25 g.

#### Resultados

Os valores de LC<sub>50</sub> observados para as espécies de peixes testados foram todos maiores do que 2000 mg/L. Estes resultados são consistentes com os resultados apresentados no Exemplo 2 e apóio a conclusão dos compostos da invenção, tal como Blankophor® BA, não são substancialmente tóxico a uma variedade de espécies de peixe, incluindo esses de importância comercial.

### Exemplo 4

#### Eficácia terapêutica de Blankophor® BA em um modo de infecção facilmente de Material e Métodos de saprolegniose

A tilápia híbrido (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*), com um peso comum de 20 g foram tratados contra ectoparasitos empregando 25 µg/ml de formaldeído (37% v/v) duas semanas antes da experiência, e foram mantidos em uma temperatura constante de 21°C em um tanque de 100 litro de polietileno. O tanque de água foi resfriado em uma temperatura inicial de 21°C a 14°C durante um período de 10 dias. A água foi mantida em uma temperatura constante de 14°C e os peixes foram aclimados durante 4 dias. A ten-

são física de abrasão foi então aplicada agitando-se 40 peixes durante 10 segundos dentro de uma rede de plástico (30 x 20 cm). Seguindo isto, uma infusão de chá de aço imaculado estéril contendo 60 semente de trevo revestido com hifae de *Saprolegnia parasitica* T-1 (7 dia de cultura velha em médio de GP-PS às 18°C) foi adicionado a cada tanque, no qual a densidade de peixe foi 20 peixes por 100 litros. Este tratamento permanece 48 h e permitir a dispersão de zoosporos que foram produzidos. A densidade do zoosporos na água foi determinada de acordo com o método descrito abaixo, e foi estimado como  $5 \times 10^2 - 2 \times 10^3$  zoosporos por litro. Os peixes foram então transferidos a tanques diferentes, e tratado com Blankophor® BA (200, 100, 50 ou 25 mg/L) ou Malachite Green (0,25 mg/L) durante 8 h às 13-14°C, com 10 peixes por 100 L de água. Os tratamentos foram aplicados em 2º, 4º e 6º dia seguinte iniciação da experiência. Os peixes foram monitorados durante 14 dias para a presença de qualquer lesão revestida com hifae, indicativo de infecção de *Saprolegnia*. A biópsias de pele de peixe doente e moribundo foi conferida microscopicamente (10x e 40x ampliação). A Morbidez e mortalidade foi monitoradas diariamente. Os peixes moribundos e ou mortos foram removidos de todos os tanques durante o período experimental.

A determinação de densidade de zoospore na água foi realizada de acordo com Willoughby, L.G. (1994) *Fungi and fish diseases*, Pisces Press, Stirling, Scotland pág. 57.

Em resumo, uma amostra de 1 litro de água do tanque de 100 litro foi dividida em 1 e 10 ml alíquotas em discos de Petri estéreis. Cada amostra foi diluída com água para dar um volume final de 20 ml e então uma semente de trevo estéril foi adicionada para atrair e manter o zoosporos. Todas as amostras de água foram incubadas em temperatura ambiente durante 72 h permitindo germinação de esporo. A densidade do zoosporos foi determinada de acordo com o número de sementes revestida com micélio visível.

### Resultados

Os peixes infectados de *Saprolegnia* foram tratados com Blankophor® BA a concentrações diferentes (100 e 200 mg/L), de acordo com os valores de MIC determinados. Os tratamentos foram realizados nos 2º, 4º e 6º dias após da iniciação da infecção, e cada tratamento foi durante um período de 8 h. As peixes tratados com 0.25 mg/L Malachite Green serviu como um controle de tratamento positivo. Os peixes foram monitorados durante 14 dias. Todos os peixes mortos foram avaliados clinicamente, e exibem lesões de *Saprolegnia* significantes, como determinado microscopicamente e confirmado por cultura positiva de *Saprolegnia*. Os resultados do tratamento com Blankophor® BA são resumidos na Figura 2, e mostra que Blankophor® BA é tão efetivo quanto Malachite Green em permitir sobrevivência de *Saprolegnia* seguinte. Todos os peixes tratados com Blankophor BA sobrevivem pelo menos 10 dias de iniciação seguinte da infecção, em contraste com peixe não tratado que progressivamente morrem no 3º dia.

Devido à eficácia elevada do tratamento com 100 mg/L Blankophor® BA, experiên-

cias adicionais foram realizadas empregando baixas concentrações de Blankophor® BA (50 e 25 mg/L). Como nas experiências prévias, os peixes infetados foram tratados em tanques contendo concentrações diferentes do composto no 2º, 4º e 6º dias após a iniciação da infecção. Além disso, dois regimes de tratamentos adicionais foram adicionados isto é 50 mg/L (administrado nos 2º e 9º dias após iniciação da infecção) e 100 mg/L (administrado nos 2º dia após iniciação da infecção). Os resultados são resumidos na Figura 3 e indicam que Blankophor® BA foi altamente efetivo prevenindo e tratando infecção de saprolegniose de fase inicial em tilápia, até mesmo a uma concentração tão baixo quanto 25 mg/L.

A observação clínica de peixe tratado com dosagens elevadas (50 e 100 mg/L) de Blankophor® BA indicado que os espécimes estavam livre de lesões (um sinal clínico típico) e além disso, foram negativos em cultura para *Saprolegnia*. Além disso, biópsias de escala e material de barbatana indicar diferenças significantes no *hyphae Saprolegnia* removido de peixe tratado com Blankophor® BA 25 (mg/L) contra isso removido de peixe não tratado. Especificamente, a forma exibida “normal” estrutura de hifal *Saprolegnia*, ao mesmo tempo em que o hifae exibido posterior que foram severamente danificado, e consideravelmente magro.

Formalina (37% de formaldeído v/v) foi também testado no modelo de tilápia-saprolegniose. Em uma concentração de 100 mg/L (administrado nos 2º, 4º e 6º dias após a iniciação da infecção) 70% do peixe morreram dentro de 14 dias (dados não mostrados). Em uma concentração de 50 mg/L, a eficácia terapêutica foi observada para ser similar a este Blankophor® BA (Figura 3). Formalina não é um tratamento possível para saprolegniose, entretanto, que formaldeído tem vários efeitos danosos sérios em animais e o ambiente. Por exemplo, é uma neurotoxina e carcinógeno provável para humanos; diminuindo a concentração de oxigênio solúvel em água, e é um *algaecide*.

#### Exemplo 5

#### Eficácia Terapêutica de Blankophor® BA em um modo de infecção estabelecida de Materiais e métodos de saprolegniose

Tilápia foram expostos a *S. parasitica* e tratado com Blankophor® BA (100, 50 e 25 mg/L), como descrito no Exemplo 4, com a exceção que Blankophor® BA tratamento foi iniciado no 3º dia após iniciação da infecção, e repetido no 8º dia. Pelo ponto de partida do Blankophor® BA tratamento, aproximadamente 50% do peixe tendo estabelecido infecção, como indicado pela presença de lesões de pele brancas e uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30%.

#### Resultados

Figura 4 mostra que neste modelo de saprolegniose estabelecido, tratamento com Blankophor® BA (50 e 100 mg/L) foi altamente efetivo em promotores de sobrevivência de peixe infetado. A diferença entre o controle não tratado e peixe tratado de Blankophor® foi

altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

#### Exemplo 6

##### Campo de tentativa não randomizado de Blankophor® BA tratamento para oomiceto simultâneo e doenças parasitárias

5 A transferência seguinte de 2000 peixe tilápia híbrido (20-30 g) para uma lagoa de cimento ( $1 \times 10^5$  L, 21 a 25°C), emplastros brancos de micélio filamentosos foram observados no corpo e barbatanas de peixe, revestimento na maioria dos casos de cerca de 80% da superfície de corpo. O micélio aparece cerca de quatro dias após da transferência, presumivelmente devido a infecção oportunística através de *Saprolegnia sp.* tensão de manipulação  
10 seguinte. Morte de 20 a 30 peixes por dia foi registrada. Todos os peixes mortos foram revestidos com micélio, característica de *Saprolegnia sp.*, e foram também encontrados para ser infetado com os parasitas *Gyrodactylus sp.* e *Trichodina sp.*

A capacidade de água na lagoa foi diminuída a  $3 \times 10^4$  L, e tratamento com Blankophor® BA (50 mg/L) foi iniciado. Um regime de 3 tratamentos (8 h cada) com 48 hora de intervalos entre eles foi empregado.  
15

A redução significativa na prevalência e intensidade de saprolegniose foi observada após o primeiro tratamento; nenhuma morte adicional foi registrada e os peixes voltaram ao comportamento normal. Os peixes foram visualmente e microscopicamente examinados 2 dias após do fim dos tratamentos, e foram encontrados para ser livre de ambos *Saprolegnia sp.* e os parasitas *Gyrodactylus sp.* e *Trichodina sp.*  
20

#### Exemplo 7

##### Análise de microscopia de elétron de levedura do efeito de Blankophor® BA em Materiais e Métodos de *S. parasítica*

25 *S. parasítica* T-1 hifae e cistos de um 5 dia RPMI-1640 cultura de caldo, foram expostos a concentrações diferentes de Blankophor® BA (10, 25, 100 ou 1,000 mg/L) durante períodos diferentes de tempo. Os espécimes foram fixados durante a noite em 2% glutaraldeído, então com 1% OsO<sub>4</sub> durante 2 h em temperatura ambiente, e desidratado em concentrações ascendendo de álcool (25-100%) e seco. As amostras foram vistas com um microscópio de elétron de levedura óptica Leo 982 em uma aceleração de 6 kV.

#### 30 Resultados

Microscópio de elétron de levedura (SEM) de hifae de *S. parasítica* e cistos mostram tratamento com Blankophor® BA (1,000 mg/L) resultado altamente deformado, enrugado, e paredes celulares desfalecidas (Figura 5A), considerando o controle sem tratar exibe paredes celulares não danificadas (Figura 5B). Estes resultados fortemente apóiam a conclusão que Blankophor® BA rompe a integridade da parede celular em *Saprolegnia*. Adequadamente, o mecanismo de ação de Blankophor® BA pode envolver um ou mais alvos específicos na parede celular de oomiceto.  
35

Exemplos 8-10 descrevem uma bateria de toxicidade biológica estuda, realizada para verificar que compostos da invenção são organismos não tóxicos a não alvo.

#### Exemplo 8

##### Toxicidade de Blankophor® BA para métodos e Materiais de ratos

5 Blankophor® BA foi preparado em várias concentrações em 5% dextrose e filtro esterilizados passando-se por um estéril de 0,2 µm do filtro de acetato celuloso (Schleicher & Schuell, Dassel, a Alemanha). Ratos de ICR albinos masculinos (peso ~30 g) foram injetados através da veia de rabo com várias doses de Blankophor® BA. Cada forma de dosagem foi administrada intravenosamente como única injeção de bolo de 0,1 ml da mesma dose  
10 durante 10 min para um grupo de 10 ratos até a morte foi observada. A sobrevivência de ratos que receberam a dose máxima tolerada (MTD) foi monitorado durante 8 dias.

##### Resultados

A dose máxima tolerada (MTD) de Blankophor® em ratos de ICR foi encontrada a ser > 1 g/kg, confirmando que é um composto seguro, como previamente determinado (*Stilbene Fluorescent Whitening Agents Category*, submetida à US Environmental Protection Agency by the ETAD Fluorescent Whitening Agent Task Force, em 6 de outubro de 2005).  
15

#### Exemplo 9

##### Toxicidade de Blankophor® BA para zooplankton

*Daphnia sp.* é um crustáceo plâncton pequeno (0,2 a 5 mm em comprimento), geralmente empregado como um modelo para toxicidade aquática.  
20

##### Materiais e Métodos

*Daphnia* (~ 1,000 células/L água) foi exposto a Blankophor® BA 100 e 1,000 mg/L. A experiência foi realizada em frascos revestidos (100 frasco de ml/per), equipado com fornecimento de ar. Os frascos foram incubados em temperatura ambiente durante 48 h, e a motilidade de *Daphnia* foi registrada.  
25

##### Resultados

Após 48 h de incubação, nenhuma diferença foi notada entre *Daphnia* que foi exposta a Blankophor® BA, e o grupo de controle não exposto, indicando Blankophor® BA não é tóxico a este organismo.  
30

#### Exemplo 10

##### Toxicidade de Blankophor® BA para fitoplancto

O método de Espectroscopia de Excitação Fluorescente prolongada (DFES) foi empregado para avaliação qualitativa e quantitativa da influência de Blankophor® BA na população natural de fitoplancto, e em tensões de algas específicas. A fluorescência prolongada é uma característica única de células ativas de fotosinteticamente, como é um resultado de recombinação que acontece no *thylakoids* na escuridão (Yacobi Y. Z., V. Gerhardt, Y., Gonen-Zurgil, e A. Sukenik. 1998. Espectroscopia de excitação de fluorescência prolongada:  
35

um método rápido para a avaliação qualitativa e quantitativa de população natural de fitoplancto. Wat. Res. 00:1-6).

#### Materiais e Métodos:

5 Amostras de Lago Kinneret e culturas puras de *Peridinium sp.* e *Microcystis sp.* foi exposto a Blankophor® BA (100 mg/L), para alguns minutos e a concentração de clorofila-a foi determinado (em duplicata) de acordo com o espectro de excitação examinado (faixa de 400 a 730 nm). Além disso, a amostra exposta e não exposta foram avaliadas para captação de carbono com uma técnica <sup>14</sup>C.

#### Resultados

10 A atividade de Fotosintético em amostra de água do mar da Galiléia não foi afetado danosamente seguinte exposição a Blankophor® BA (100 mg/L), desde que a concentração de clorofila total foi 9,2 µg/L (média), como comparado a 4,6 µg/L (média) após a exposição. Similarmente, quando uma cultura pura de *Microcystis* foi exposta a Blankophor® BA (100 mg/L), nenhuma diferença em atividade de fotosintético foi notada como comparado a amostra não tratada.

15 Os resultados do estudo de captação de <sup>14</sup>C-carbono, mostrado na Figura 6, são consistentes com as experiências de DFES, e indica aquela exposição a Blankophor® BA não diminui a atividade de fotosintético em culturas puras de várias espécie de algas (*Chlorella*, *Microcystis*, *Peridinium* e *Melosira*), nem na população de algas total em no mar da Galiléia. Levado junto, estes resultados preliminares apóiam a conclusão que Blankophor® BA não é tóxico a fitoplancto.

20 As conclusões para identificar um tratamento efetivo para saprolegniose para substituição perigosa após técnicas de tratamentos, tal como Malachite Green, foram avaliados vários antimicrobial e agentes antifungos, detergentes e desinfetantes (Tabela 4). Com base na combinação de resultados obtidos nos vários sistemas de ensaio, e parâmetros de segurança animal, impacto ambiental e custo, cada um dos compostos foi nomeado um índice de utilidade (UI). Dos compostos completamente avaliados, Blankophor® BA tem o UI mais elevado. Isto sugere fortemente que derivados de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico, como fornecido por Blankophor® BA, pode servir como alternativas efetivas 25 terapeuticamente, seguras e econômicas para Malachite Green.

Tabela 4. Utilidade de vários compostos contra *Saprolegnia*

| Composto               | Atividade in vitro (MIC) | Toxicidade <sup>1</sup> | Eficiência terapêutica | custo | Índice de Utilidade <sup>2</sup> (UI) |
|------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------|---------------------------------------|
| Peróxido de hidrogênio | Elevado (10mg/L)         | Moderado                | moderado               | baixo | (Problemática moderada em             |

|                                |                                 |                                |                                |         |  |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------|--|
|                                |                                 |                                |                                |         | reservatório de terra)                     |
| Cloreto de sódio               | Extremamente baixo (30,000mg/L) | ND                             | ND                             | Elevado | Baixo                                      |
| Percarbonato de sódio          | Elevado (10 mg/L)               | Elevado (em baixa temperatura) | Elevado (em baixa temperatura) | Baixo   | Baixo                                      |
| Detergentes incluindo agrosept | Variável                        | Elevado                        | Elevado                        | Baixo   | Baixo                                      |
| Formaldeído                    | Moderado (100 mg/L)             | Moderado                       | Moderado                       | Baixo   | Baixo segurança negada e perfil ambiental) |
| Pyceze®                        | Moderado (100 mg/L)             | Moderado                       | Não efetivo                    | Elevado | Baixo                                      |
| Anfotericina B                 | Elevado (0,1-0,5 mg/L)          | Moderado                       | ND                             | Elevado | Baixo                                      |
| Blankophor®                    | Moderado (100 mg/L)             | baixo                          | Muito efetivo                  | Baixo   | elevado                                    |

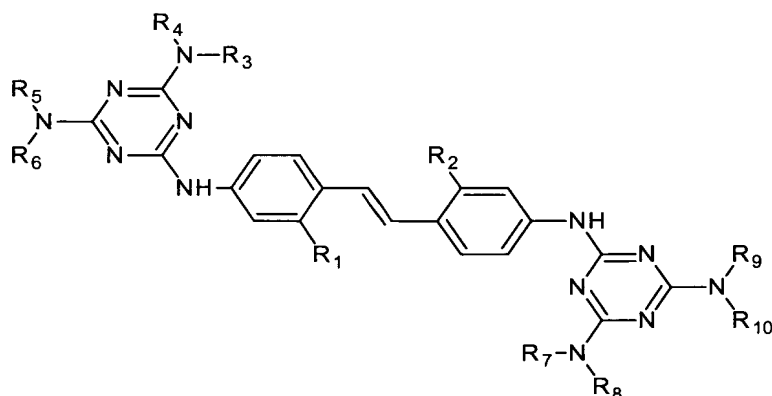
<sup>1</sup>Toxicidade foi definida como: elevado=50ppm; moderado=ppm50-200; e baixo = >1000 ppm.

<sup>2</sup>Índice de utilidade (UI): Índice de medição a utilidade do composto considerando-se os parâmetros de toxicidade, eficácia terapêutica e custo.

- 5 Ao mesmo tempo em que certas modalidades da invenção têm sido ilustradas e descritas, estará claro que a invenção não é limitada às modalidades descritas aqui. Numerosas modificações, alterações, variações, substituições e equivalentes serão aparentes por alguém versado na técnica sem partir do espírito e escopo da presente invenção como descrito pelas reivindicações anexadas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para prevenir ou tratar uma infecção de oomiceto em um organismo aquático, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a etapa de contatar o organismo aquático com uma quantidade efetiva de pelo menos um ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico derivado da Fórmula (I):



Fórmula (I)

onde R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são os mesmos ou diferentes e são cada independentemente selecionados do grupo consistindo em SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub>Na, SO<sub>3</sub>K, SO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> e H;

R<sub>3</sub> a R<sub>10</sub> são os mesmos ou diferentes e são selecionados do grupo consistindo em H; C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila linear ou ramificada; C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquenila linear ou ramificada, onde a referida alquila ou alquenila são cada independentemente substituída ou não substituída com um grupo hidroxila, carboxila, ou carboxamida; fenila; e fenila substituída com R<sub>1</sub> ou R<sub>2</sub> onde R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são como definido acima;

ou um ou mais de R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> e R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> ou R<sub>9</sub> e R<sub>10</sub>, junto com o nitrogênio a qual eles são ligados, forma um anel de heterocíclico que pode também compreende um ou mais heteroátomos adicional selecionado de N, O e S; e sais, hidrato, solvatos e polimorfos destes.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que dois ou mais de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> são o mesmo e é selecionado do grupo consistindo em CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> e H; ou um ou mais de R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> junto com o nitrogênio para o qual eles são ligados, forma um anel de morfolinila.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que dois ou mais de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>9</sub> e R<sub>10</sub> são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em fenila e fenila substituído com SO<sub>3</sub>Na.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em SO<sub>3</sub>H e SO<sub>3</sub>Na.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são diferentes e são selecionados do grupo consistindo em SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub>Na, SO<sub>3</sub>K,

SO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> e H.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é selecionado do grupo consistindo em ácido 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfônico; dissódico 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)estilbeno-2,2'-disulfonato; sódio de potássio 4,4'-bis-(6-anilino-4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)estilbeno-2,2'-disulfonato; ácido 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-(4-anilino-6-((2-hidroxietil)metilamino)-s-triazina-2-il)amino) -, sal de dissódico; dissódico 4,4'-bis[[4-(4-anilino-6-morfolino-1,3,5-triazina-2-il)amino]estilbeno-2,2'-disulfonato; tetrasódio 4,4'-bis[[4-[bis(2-hidroxietil)amino]-6-(4-sulfonatoanilino)-1,3,5-triazina-2-il]amino]estilbeno-2,2'-disulfonato; tetrasódio 4,4'-bis[[4-[bis(2-hidroxipropil)amino]-6-[(4-sulfonatofenil)amino]-1,3,5-triazina-2-il]amino]estilbeno-2,2'-disulfonato; e ácido 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-[[4-[(2-carbamoiletil)(2-hidroxietil)amino]-6-(p-sulfoanilino)-s-triazina-2-il]amino]-, sal de tetrasódio.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oomiceto é selecionado do grupo consistindo em *Saprolegnia spp.*, *Aphanomyces Spp.* e *Branchiomyces spp.*

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oomiceto é *Saprolegnia parasitica*.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o organismo aquático é selecionado do grupo consistindo em peixe, ovas de peixe e molusco.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peixe é selecionado do grupo consistindo em perca-gigante, baixo, brema, carpa, bagre, *chub*, enguia, enguia jovem, linguado, dourado, peixe de aquário, linguado gigante, carpa chinesa, *labrax*, tainha, peixe-espátula, linguado europeu, pompom, peixe vermelho, *red-drum*, salmão, sola, esturjão, tilápia, truta, atum e baleia branca.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é fornecido como uma solução.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é presente na solução em uma concentração de cerca de 20 a cerca de 200 mg/L.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é presente na solução em uma concentração de cerca de 25 mg/L.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa contatada é durante um período de cerca de 2 a cerca de 16 horas.

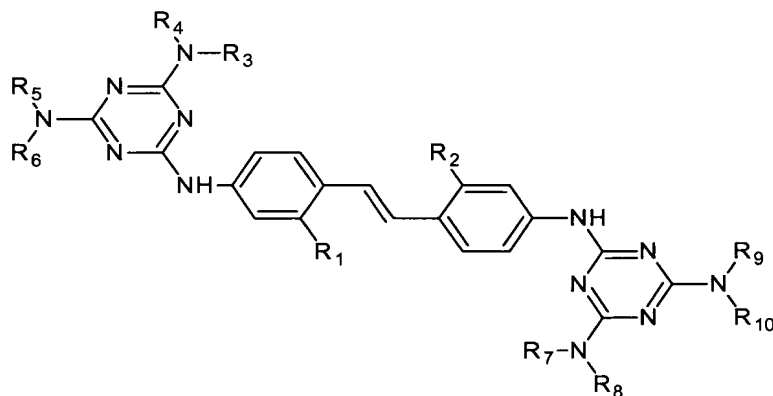
15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa contatada é durante um período de cerca de 8 horas.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa contatada é repetida a 48 horas de intervalos.

5 17. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a infecção de oomiceto é simultânea com ou acompanhado por uma infecção parasitária.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a infecção parasitária é causada por pelo menos um parasita selecionado do grupo consistindo em *Amyloodinium spp.*, *Argulus Spp.*, *Ascocotyle Spp.*, *Bothricephalus Spp.*, *Camallanus Spp.*, *Capilaria Spp.*, *Centrocestus Spp.*, *Chilodonella Spp.*, *Coccidia Spp.*, *Contracaecum Spp.*, *Cryptobia Spp.*, *Cryptocaryon Spp.*, *Dactylogyrus Spp.*, *Dermocystidium Spp.*, *Ergasilus Spp.*, *Euclinostomum Spp.*, *Gyrodactylus Spp.*, *Hexamita Spp.*, *Ichtyobodo Spp.*, *Ichtyophthirius Spp.*, *Lernaea Spp.*, *Metacercarius Spp.*, *Microsporidia Spp.*, *Myxosporea Spp.*, *Oodinium Spp.*, *Sanguinicola Spp.*, *Sessiline Spp.*, *Spironucleus Spp.*, *Tetrahymena Spp.*, *Trichodina Spp.*, *Trichodinella Spp.* e *Tripartiella spp.*

19. Método de desinfetar equipamento empregando para aumentar um organismo aquático, o equipamento é contaminado com um oomiceto, o método, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a etapa de contatar o equipamento com uma quantidade efetiva de pelo menos um 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico derivado ácido da Fórmula (I):



Fórmula (I)

onde  $R_1$  e  $R_2$  são os mesmos ou diferentes e são cada independentemente selecionado do grupo consistindo em  $\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $\text{SO}_3\text{K}$ ,  $\text{SO}_3\text{NH}_4$  e  $\text{H}$ ; e onde  $R_3$  a  $R_{10}$  são os mesmos ou diferentes e são selecionados do grupo consistindo em  $\text{H}$ ;  $\text{C}_1\text{-C}_6$  alquila linear ou ramificada;  $\text{C}_2\text{-C}_6$  alquenila linear ou ramificada, onde a referida alquila ou alquenila são cada independentemente substituída ou não substituída com um grupo hidroxila, carboxila, ou carboxamida; fenila; e fenila substituída com  $R_1$  ou  $R_2$  onde  $R_1$  e  $R_2$  são como definido acima; ou um ou mais de  $R_3$  e  $R_4$ ,  $R_5$  e  $R_6$ ,  $R_7$  e  $R_8$  ou  $R_9$  e  $R_{10}$ , junto com o nitrogênio a qual eles são ligados, forma um anel de heterocíclico que pode também compreende um ou mais

heteroátomos adicional selecionado de N, O e S; e sais, hidrato, solvatos e polimorfos disso.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que dois ou mais de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> e II; ou um ou mais de R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> junto com o nitrogênio a qual eles são ligados, forma um anel de morfolinila.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, em que dois ou mais de R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>9</sub> e R<sub>10</sub> são o mesmo e é selecionado do grupo consistindo em em fenila e fenila substituído com SO<sub>3</sub>Na.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são os mesmos e são selecionados do grupo consistindo em SO<sub>3</sub>H e SO<sub>3</sub>Na.

23. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são diferentes e são selecionados do grupo consistindo em SO<sub>3</sub>H, SO<sub>3</sub>Na, SO<sub>3</sub>K, SO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> e II.

24. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o derivado de ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é selecionado do grupo consistindo em ácido 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)estilbeno-2,2'-dissulfônico; dissódico 4,4'-bis-(6-anilino-1,4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)estilbeno-2,2'-disulfonato; ácido de sódio de potássio 4,4'-bis-(6-anilino-4-bis(2-hidroxietil)amino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)estilbeno-2,2'-disulfonato; 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-(4-anilino-6-((2-hidroxietil)metilamino)-s-triazina-2-il)amino)-, sal de dissódico; dissódico 4,4'-bis[[4-anilino-6-morfolino-1,3,5-triazina-2-il)amino]estilbeno-2,2'-disulfonato; tetrasódio 4,4'-bis[[4-bis(2-hidroxietil)amino]-6-(4-sulfonatoanilino)-1,3,5-triazina-2-il)amino] estilbeno-2,2'-disulfonato; ácido tetrasódio 4,4'-bis[[4-bis(2-hidroxipropil)amino]-6-[(4-sulfonatofenil)amino]-1,3,5-triazina-2-il)amino]-estilbeno-2,2'-disulfonato; e 2,2'-estilbenodissulfônico, 4,4'-bis-[[4-[(2-carbamoiletil)(2-hidroxietil)amino]-6-(p-sulfoanilino)-s-triazina-2-il)amino]-, sal de tetrasódiol.

25. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oomiceto é selecionado do grupo consistindo em *Saprolegnia spp.*, *Aphanomyces Spp.* e *Branchiomyces spp.*

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oomiceto é *Saprolegnia parasitica*.

27. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o organismo aquático é selecionado do grupo consistindo em peixe, ovas de peixe e molusco.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peixe é selecionado do grupo consistindo em perca-gigante, baixo, brema, carpa, bagre, *chub*, enguia, enguia jovem, linguado, dourado, peixe de aquário, linguado gigante, car-

pa chinesa, *labrax*, tainha, peixe-espátula, linguado europeu, pompom, peixe vermelho, *red-drum*, salmão, sola, esturjão, tilápia, truta, atum e baleia branca.

29. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um derivado ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico é fornecido como uma solução.

30. Método, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um derivado ácido 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico está presente na solução em uma concentração de cerca de 20 a cerca de 200 mg/L.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um derivado ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinailamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico estão presentes na solução em uma concentração de cerca de 25 mg/L.

32. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa contatada é durante um período de cerca de 2 a cerca de 16 horas.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa contatada é durante um período de cerca de 8 horas.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que contatar é repetido a 48 horas de intervalos.

35. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o equipamento é também contaminado com pelo menos um parasita.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um parasita é selecionado do grupo consistindo em *Amyloodinium spp.*, *Argulus Spp.*, *Ascocotyle Spp.*, *Bothricephalus Spp.*, *Camallanus Spp.*, *Capilaria Spp.*, *Centrocestus Spp.*, *Chilodonella Spp.*, *Coccidia Spp.*, *Contraecaecum Spp.*, *Cryptobia Spp.*, *Cryptocaryon Spp.*, *Dactylogyrus Spp.*, *Dermocystidium Spp.*, *Ergasilus Spp.*, *Euclinostomum Spp.*, *Gyrodactylus Spp.*, *Hexamita Spp.*, *Ichtyobodo Spp.*, *Ichtyophthirius Spp.*, *Lernaea Spp.*, *Metacercarius Spp.*, *Microsporidia Spp.*, *Myxosporea Spp.*, *Oodinium Spp.*, *Sanguinicola Spp.*, *Sessiline Spp.*, *Spironucleus Spp.*, *Tetrahymena Spp.*, *Trichodina Spp.*, *Trichodinella Spp.* e *Tripartiella spp.*

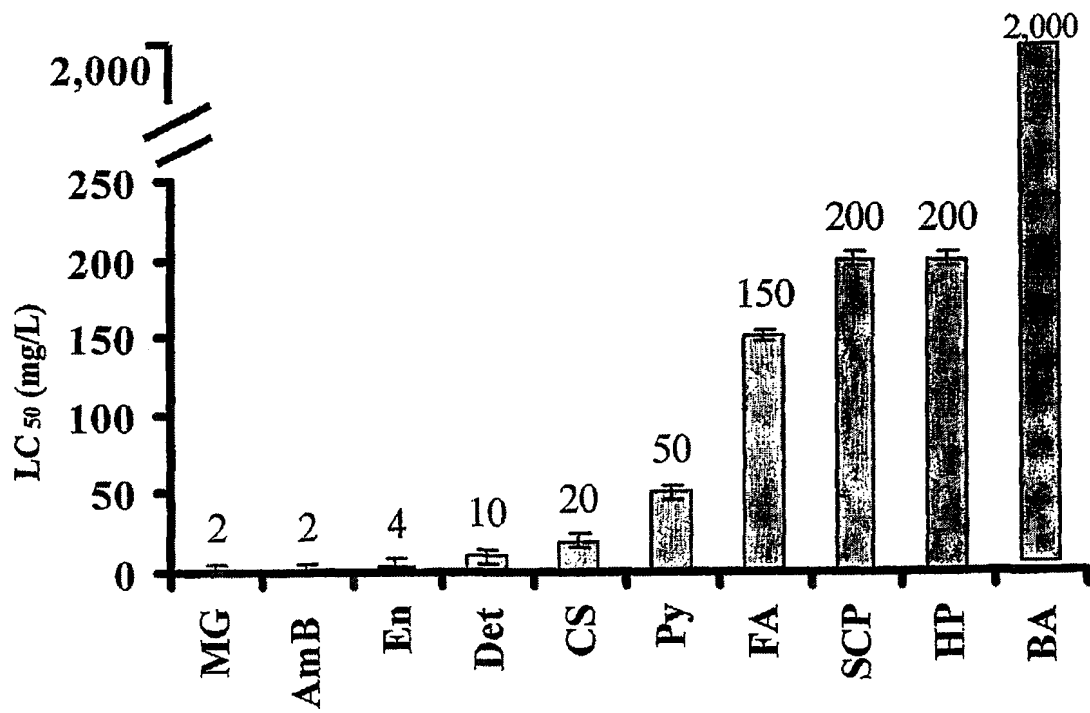


FIGURA 1

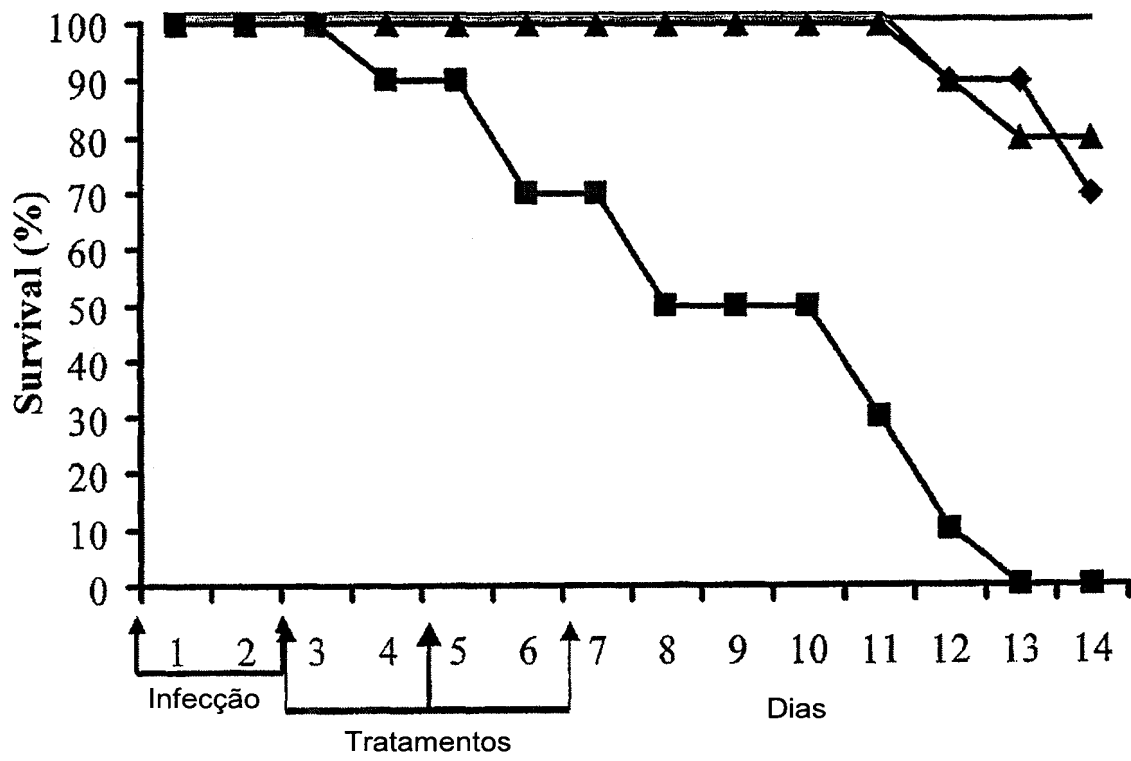


FIGURA 2

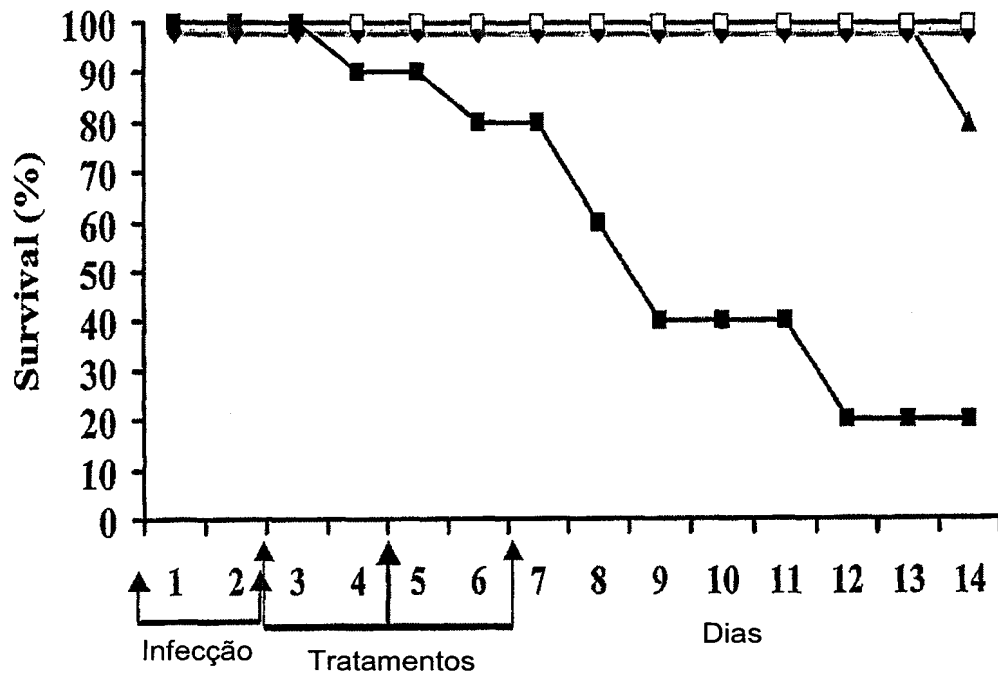


FIGURA 3

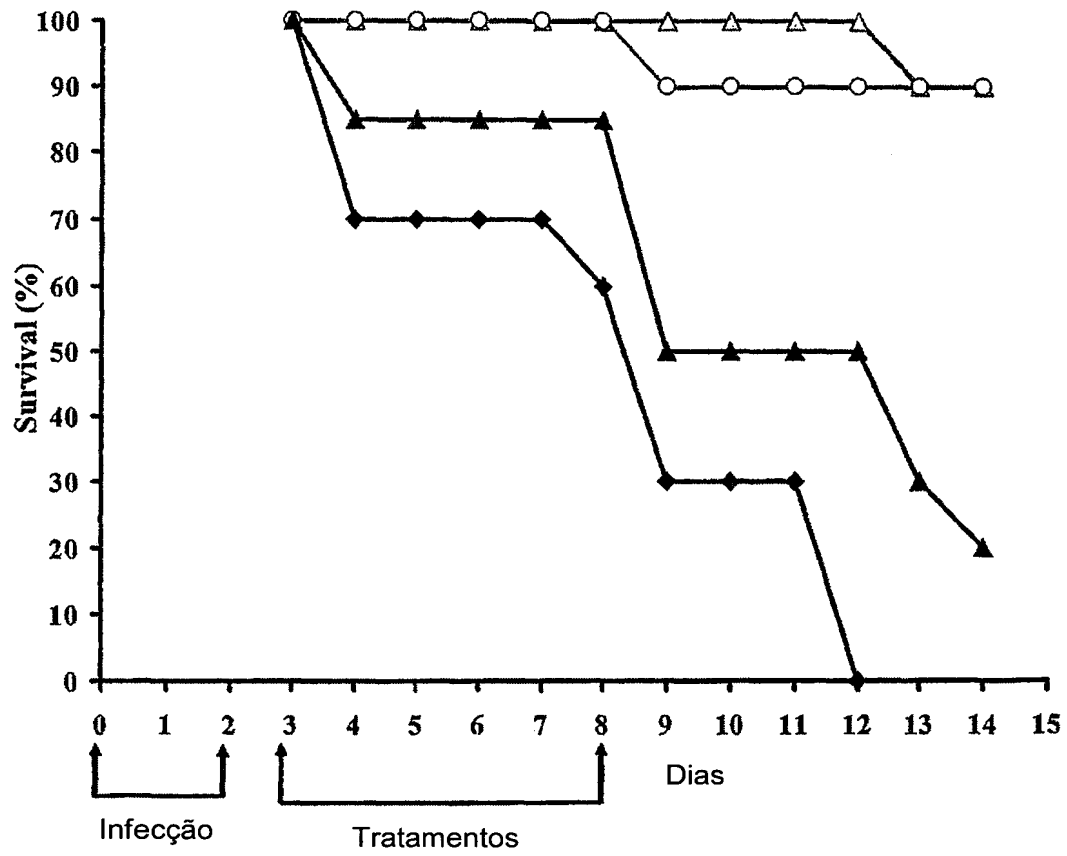
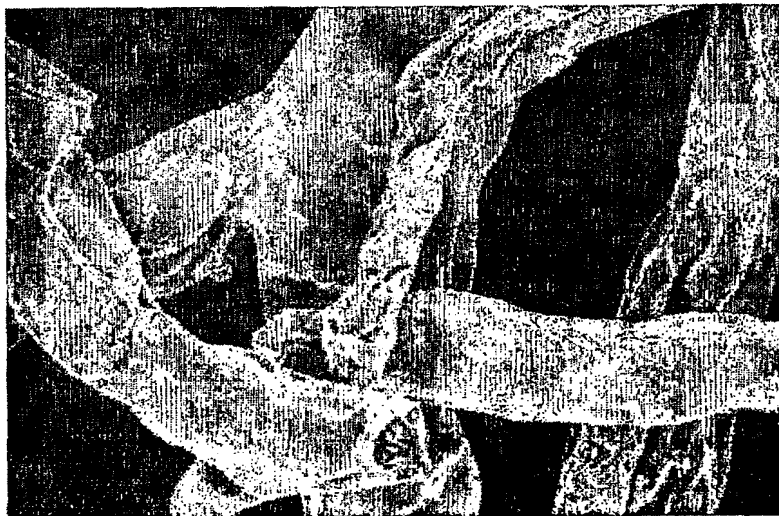


FIGURA 4

FIGURA 5A



FIGURA 5B



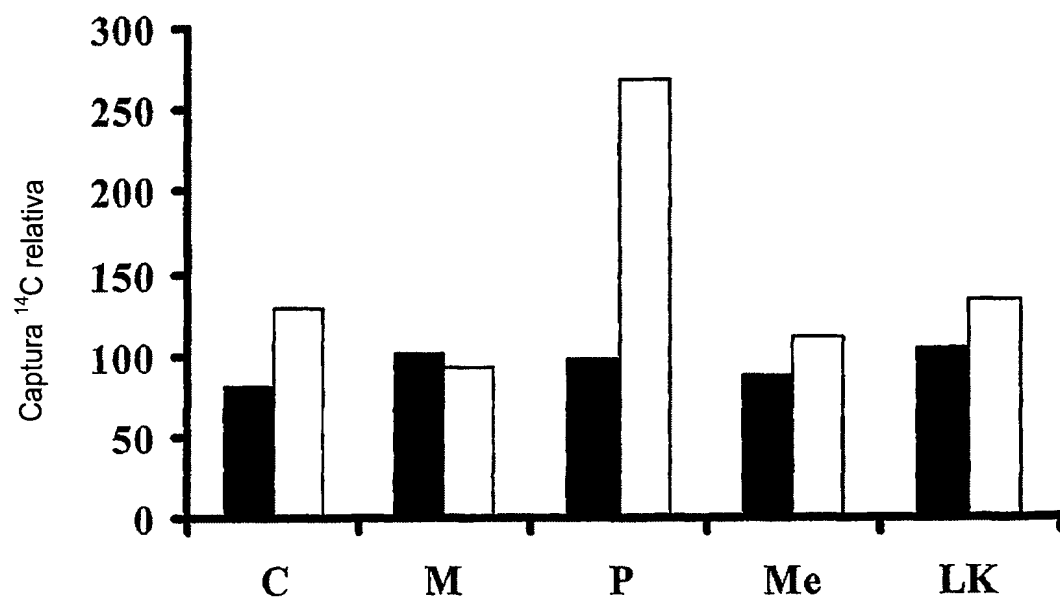


FIGURA 6

## RESUMO

### “USO DE DERIVADOS DE ESTILBENO PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE INFECÇÕES POR FUNGOS AQUÁTICOS”

5 A invenção refere-se aos métodos de tratamento e prevenção de infecções por fungos aquáticos em organismos aquáticos e métodos de desinfetar equipamento empregado em organismos aquáticos aumentado. Os métodos compreendendo o uso de um ou mais derivado de estilbeno, incluindo derivado de ácidos 4,4'-bis-(1,3,5-triazinilamino)estilbeno-2,2'-dissulfônico.