República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020001619-5 A2

(22) Data do Depósito: 26/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 21/07/2020

(54) Título: TOLANOS SUBSTITUÍDOS PARA A MODULAÇÃO DA COLONIZAÇÃO MICROBIANA

(51) Int. Cl.: A61K 31/05; A61K 31/09; A61P 31/00.

(30) Prioridade Unionista: 25/05/2018 US 62/676,676; 27/07/2017 US 62/537,661.

(71) Depositante(es): BIOMENDICS, LLC.

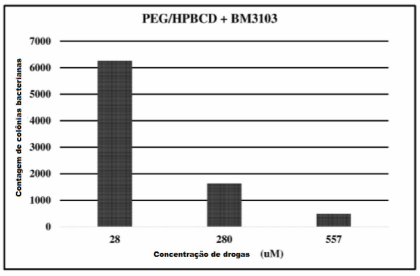
(72) Inventor(es): MCGUIRE, KAREN, M; TSAI, CHUN-CHE; PLOCINIK, EMILY, L.; MCCORMICK, ALEESHA, M..

(86) Pedido PCT: PCT US2018043833 de 26/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/023425 de 31/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 24/01/2020

(57) Resumo: São descritos métodos para desinfetar uma superfície física ou biológica por contato com uma formulação antimicrobiana que compreende um composto de tolano substituído, sendo as substituições, por exemplo, um ou mais substituintes alcóxi (por exemplo, metóxi) e hidróxi em um ou ambos os anéis fenil do tolano Os compostos e métodos são -státicos e/ou -cidas, dependendo da dose e do micróbio suspeito. Micróbios patogênicos suspeitos incluem bactérias Gram-negativas, como P. aeruginosa e E. coli, bactérias Gram-positivas, como N. aureus, incluindo MRSA, e patógenos fúngicos, como Candida e C. albicans. Também são descritos métodos para inibir ou interromper a formação de biofilme de um micróbio ou micróbios.



RELATÓRIO DESCRITIVO

TOLANOS SUBSTITUÍDOS PARA A MODULAÇÃO DA COLONIZAÇÃO MICROBIANA

PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade do Pedido Provisório US 62/537.661, depositado em 35 USC. § 111(b) em 27 de julho de 2017, bem como o Pedido Provisório US 62/676.676, depositado em 35 USC. § 111(b) em 25 de maio de 2018. As divulgações completas de todos os aplicativos mencionados acima são expressamente incorporadas por referência aqui para todos os fins.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se geralmente ao campo da microbiologia e, mais particularmente, a compostos, formulações e métodos para a redução do crescimento microbiano ou eliminação de colônias microbianas, particularmente patógenos, entrando em contato com uma superfície física ou biológica com os compostos ou uma formulação dos compostos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] A designação de um micro-organismo como questionável é baseada em seu potencial patogênico e capacidade de causar infecções ou doenças. Bactérias patogênicas são encontradas em famílias Gram-negativas e Gram-positivas. Alguns patógenos microbianos relevantes incluem: bactérias Gram-positivas (como Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Enterococcus spp., Clostridium tetani, Listeria monocytogenes e Clostridium perfringens), bactérias Gram-negativas (como Pseudomonas spp., Klebsiella spp., Salmonella spp. e Enterobacteriaceae) e fungos (como Candida albicans, Candida parapsilosis, Malassezia furfur, Trichophyton spp., Trichoderma e Aspergillus spp.). Os patógenos da pele clássicos incluem bactérias como Staphylococcus aureus, várias Pseudomonas spp. e fungos como Candida albicans.

[0004] É aceito conhecimento que o uso da água como um agente de limpeza

para uso médico, doméstico ou industrial pode fornecer o sustento adequado para a adesão, proliferação e colonização de micro-organismos. Sem o uso de agentes de limpeza, conservantes ou agentes antibacterianos existentes suficientes, um produto ou superfícies físicas onde o produto é preparado, podem ser infectados com uma variedade de organismos microbianos. Em última análise, isso pode se manifestar em produtos descoloridos, odorosos ou que contêm mofo ou outros micro-organismos que causam deterioração do produto, tornando-os inaceitáveis para os consumidores. Além disso, a contaminação microbiana não visível apresenta um risco significativo de doenças transmitidas por alimentos, além de um risco significativo para a saúde do consumidor no caso de micro-organismos patogênicos. Além disso, a preparação, esterilização e limpeza de equipamentos hospitalares, instrumentos cirúrgicos e a manutenção da esterilidade dos tubos e dos materiais que interagem com o sangue e outros fluidos biológicos apresenta um desafio significativo. Finalmente, muitos micróbios tornaram-se resistentes aos antibióticos atuais, permitindo a proliferação apesar do uso das técnicas de limpeza existentes. Novos tratamentos para esses micro-organismos resistentes são desesperadamente necessários no cenário clínico.

[0005] Muitos desinfetantes representam risco para os seres humanos durante o uso, devido às propriedades que danificam os tecidos. Por exemplo, desinfetantes que contêm fenóis, cloro e outros agentes poderosos podem representar risco de danificar a pele e o tecido mucoso de um consumidor durante o uso dos produtos. A toxicidade potencial para seres humanos pode restringir os tipos de desinfetantes disponíveis para uso pelos consumidores e/ou as aplicações para as quais eles podem ser usados.

[0006] As Patentes US 6.599.945 e 7.094.809 descrevem vários compostos hidroxitolanos e seu uso na inibição da formação de partículas infecciosas do vírus do herpes ou no tratamento de gonorreia causada por Neisseria gonorrhoeae. Os compostos descritos nas Patentes US 6.599.945 e 7.094.809

mostram atividade contra Neisseria gonorrhoeae, mas não mostraram atividade contra N. meningitides, E. coli, S. aureus, S. pyogenes, P. aeruginosa e C. albicans. Quando as espécies químicas descritas neste pedido foram aplicadas a E. coli e T. Salmonella, elas exibiram atividade antibacteriana em concentrações de dosagem muito mais baixas do que as descritas em US 7.094.809. WO2009/126700 divulga o uso de compostos semelhantes para cuidados com a pele, tais como radiação UV e usos cosméticos. E US 8.716.355 (WO2011/0130468) e US 8.680.142 (WO2011/0160301) divulgam hidroxitolanos para uso como agentes antitumorais. WO2016/164531 A2 da requerente BioMendics, divulga certos compostos de estilbeno e tolano para uso como moduladores de autofagia e para aplicações de tratamento de feridas. No entanto, a utilidade potencial destes, ou outros tolanos, como compostos antibacterianos era desconhecida até a realização da presente invenção.

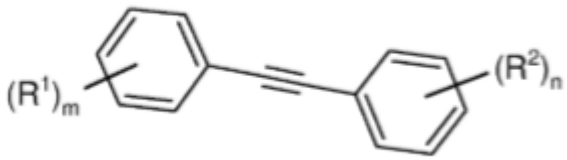
[0007] Permanece a necessidade de agentes antimicrobianos aprimorados que possam ser utilizados para tratar superfícies físicas e/ou superfícies biológicas.

SUMÁRIO

[0008] A invenção refere-se geralmente à inibição ou modulação do crescimento microbiano, particularmente em superfícies biológicas como pele, mucosa, feridas, etc., ou em superfícies físicas como mesas, balcões, instrumentos médicos, etc.

[0009] Em um primeiro aspecto, a invenção inclui um método para inibir o crescimento ou a morte de micróbios patogênicos suspeitos em uma superfície física ou biológica, compreendendo contatar a superfície física ou biológica com uma formulação antimicrobiana que compreende:

uma quantidade antimicrobianamente eficaz de um composto de tolano substituído por a estrutura (I):



(I)

em que R^1e R^2 são substituintes independentes em qualquer posição disponível dos anéis fenil, e m e n são independentemente 1, 2 ou 3, representando o número de substituintes nos anéis fenil, respectivamente; e

em que cada R^1, R^2, é selecionado independentemente de hidróxi, tiol, -(C_1-C_6)alcoxi, -(C_1-C_6)RH" em que R é O ou S e (halo)$_p$(C_1-C_6)alquil-, onde p é 1, 2 ou 3; e sais dos mesmos;

com a condição de que o composto de tolano substituído não seja 3,4',5-tri-hidroxitolano.

[00010] Por exemplo, em algumas modalidades, o composto de tolano é um alcoxitolano, em que pelo menos um dos substituintes R^1 e R^2 é -(C_1-C_6)alcoxi, por exemplo, metóxi ou etóxi. Em outras modalidades, o composto de tolano é um hidroxitolano e pelo menos um dos substituintes R^1 e R^2 é hidróxi. Em outras modalidades, o composto de tolano é um tiotolano e pelo menos um dos substituintes R^1 e R^2 é tiol. Em alguns casos, o composto de tolano é uma combinação de qualquer um dos acima.

[00011] O composto de tolano substituído inclui pelo menos um R^1 e um R^2, embora possam ser iguais ou diferentes. Por exemplo, o composto de tolano pode ser dissubstituído, trissubstituído, tetra-substituído ou substituído por 5 ou 6 substituintes, qualquer um dos quais pode ser o mesmo ou diferente. Alguns exemplos de compostos de tolano substituídos são fornecidos na Tabela A abaixo, incluindo 4,4'-di-hidroxitolano, 4,4'-di-hidroxi-3-metoxitolano; 4-hidroxi-4'-metoxitolano, 3,5,3',5' tetra-hidroxitolano, 2,4,4'-trimetoxitolano, 3,5,3',5'tetrametoxitolano e 4-hidroxi-4'-trifluorometiltiltolano.

[00012] O composto de tolano substituído pode estar presente em uma

quantidade de cerca de 0,01% a cerca de 30% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana. Por exemplo, o composto de tolano pode estar presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 25% em peso, ou de cerca de 0,1% a cerca de 20%, ou de cerca de 0,001% a cerca de 20%.A formulação pode ter um pH de cerca de 4,1 a cerca de 8,5 e pode ainda incluir um agente de limpeza, preferencialmente um que seja substancialmente livre de fenol. Em algumas modalidades, o agente antimicrobiano secundário é selecionado de diclorofeno, hexaclorofeno, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos antimicrobianos e derivados dos mesmos, compostos organometálicos, compostos de iodo, compostos de amônio quaternário, compostos de sulfônio e fosfônio, compostos de mercúrio e metais alcalinos, metais alcalino terrosos e sais de metais pesados dos mesmos, ureias, tribromossalicilanilida, 2-bromo-2-nitro-1,3-di-hidroxipropano, diclorobenzoxazolona, clorohexidina, isotiazolona, derivados de benzisotiazolona e combinações de quaisquer dois ou mais destes.

[00013] Os métodos e a formulação descritos acima podem ser utilizados para higienizar ou desinfetar superfícies, modulando o crescimento de um micróbio ou micróbios nela. Em alguns casos, a superfície é uma superfície física selecionada dentre itens como equipamentos cirúrgicos, instrumentos cirúrgicos e bancadas, tubos, seringas e semelhantes que devem ser desinfetados para permanecerem essencialmente estéreis ao longo de um procedimento. Em outras modalidades, a superfície é uma superfície física selecionada de superfícies de preparação de alimentos selecionadas de tábuas de corte, bancadas, mesas, facas, outros utensílios, utensílios de cozinha e semelhantes que possam levar à ingestão de bactérias indesejadas não desinfetadas. Em ainda outras modalidades, a superfície é uma superfície biológica em um local onde a pele não está totalmente intacta, como linhas ou orifícios intravenosos, linhas ou orifícios arteriais, linhas PICC, cateteres, drenos e locais de incisão. Tais superfícies biológicas podem incluir, por exemplo, pele, couro cabeludo, cabelo, olhos, membranas mucosas e orifícios internos ou externos.

[00014] Em outra modalidade, o método e as formulações podem ser úteis para interromper um biofilme bacteriano in situ.

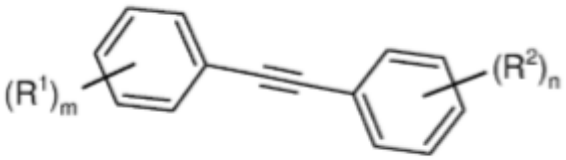
[00015] Em alguns aspectos do método, os micróbios patogênicos suspeitos são bactérias Gram-negativas, como os gêneros de Neisseria, Chlamydia, Acinetobacter, Haemophilus, Helicobacter, Proteus, Bordetella, Psuedomonas, Salmonella, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Vibrio, ou Yersinia. Em outros aspectos, os micróbios patogênicos suspeitos são bactérias Gram-positivas, como Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Clostridium, Listeria ou Corynebacterium. Em modalidades particulares, os micróbios patogênicos suspeitos são aqueles considerados patógenos importantes devido à prevalência ou resistência real ou iminente a antibióticos conhecidos de "último recurso", como meticilina, vancomicina ou carbapenemo. Esses patógenos importantes incluem cepas de *Acinetobacter baumannii* (resistente ao carbapenemo; *Pseudomonas aeruginosa* (resistente ao carbapenemo*); Enterobacteriaceae* (resistente ao carbapenemo, produtora de ESBL); *Enterococcus faecium* (resistente à vancomicina); *Staphylococcus aureus*, (resistente à meticilina, intermediário e resistente à vancomicina); *Helicobacter pylori*, (resistente à claritromicina); *Campylobacter spp*., (resistente à fluoroquinolona); *Salmonellae* (resistente à fluoroquinolona); *Neisseria gonorrhoeae* (resistente à cefalosporina, resistente à fluoroquinolona); e espécies de *E. Coli*.

[00016] Ainda em outros aspectos, os micróbios patogênicos suspeitos são fungos, como os do gênero Candida, Apergillus, Cladosporium, Epidermophytum, Epidermophytum, Microsporum, Tricophytum e Penicillium.

[00017] Em outro aspecto, a invenção inclui um método para inibir ou interromper a formação de biofilme de um micróbio ou micróbios, compreendendo contatar o micróbio com uma formulação antimicrobiana que compreende:

uma quantidade eficaz de um composto de tolano substituído por a

estrutura (I):



(I)

em que R^1e R^2 são substituintes independentes em qualquer posição disponível dos anéis fenil, e m e n são independentemente 1, 2 ou 3, representando o número de substituintes nos anéis fenil, respectivamente; e

em que cada R^1, R^2, é selecionado independentemente de hidróxi, tiol, -(C_1-C_6)alcoxi, -(C_1-C_6)RH" em que R é O ou S e (halo)$_p$(C_1-C_6)alquil-, onde p é 1, 2 ou 3; e sais dos mesmos;

com a condição de que o composto de tolano substituído não seja 3,4',5-tri-hidroxitolano.

[00018] Em certas modalidades, o composto de tolano substituído está presente na formulação antimicrobiana em uma concentração que varia de cerca de 0,008 mM a cerca de 1 mM. Em certas modalidades, o composto de tolao substituído está presente na formulação antimicrobiana de cerca de 0,625 mM.

[00019] Em certas modalidades, o composto de tolano substituído está presente na formulação antimicrobiana em uma quantidade que varia de cerca de 0,0001% a cerca de 30% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana. Em certas modalidades, o composto de tolano substituído está presente na formulação antimicrobiana em uma quantidade que varia de cerca de 0,01% a cerca de 25% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana. Em certas modalidades, o composto de tolano substituído está presente na formulação antimicrobiana em uma quantidade que varia de cerca de 0,1% a cerca de 30% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana.

[00020] Em certas modalidades, a formulação antimicrobiana é

administrada de uma vez ao dia até cerca de 6 vezes por dia. Em certas modalidades, a formulação antimicrobiana é administrada por uma via de administração selecionada do grupo que consiste em tópicos, transdérmicos, orais, nasais, oftalmológicos, óticos, intravenosos, intramusculares, subcutâneos, retais e vaginais.

[00021] Em certas modalidades, o composto de tolano substituído porpreende 4-hidroxi-4'-metoxitolano. Em certas modalidades, o micróbio ou micróbios compreende bactérias Gram-positivas. Em certas modalidades, o micróbio ou micróbios compreende bactérias Gram-negativas. Em certas modalidades, o micróbio ou micróbios compreende um fungo. Em certas modalidades, o micróbio ou micróbios compreende *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

[00022] Outras modalidades e aspectos são descritos abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00023] Os desenhos anexos, aqui incorporados e que fazem parte do relatório descritivo, ilustram a presente invenção em seus vários aspectos e, juntamente com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção. Nas figuras, a espessura das linhas, camadas e as regiões pode ser exagerada para maior clareza.

[00024] A **FIG. 1** representa um gráfico de barras dos efeitos antimicrobianos do tolano substituído BM3103.

[00025] A **FIG. 2** representa um gráfico de barras dos efeitos antimicrobianos do tolano substituído BM3103.

[00026] A **FIG. 3** representa um gráfico de barras dos efeitos antimicrobianos do tolano substituído BM3213.

[00027] A **FIG. 4** representa um gráfico de barras dos efeitos antimicrobianos do tolano substituído BM3303.

[00028] A **FIG. 5** representa a metodologia usada nos Exemplos 10-12.

[00029] As **FIGS. 6A-6B** representam um gráfico de barras (**FIG. 6A**) e uma

tabela (**FIG. 6B**) dos efeitos antimicrobianos de formulações de BM3103 em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA USA 300).

[00030] A **FIG. 7** representa um gráfico de barras dos efeitos antimicrobianos das formulações de BM3103 em *Pseudomonas aeruginosa*.

[00031] A **FIG. 8** representa um gráfico de barras dos efeitos antimicrobianos das formulações de BM3103 em *Candida albicans.*

[00032] A **FIG. 9** é um gráfico que mostra as contagens bacterianas de MRSA USA 400 após ensaio de placa de 24 h de BM3103 em uma formulação de gel de álcool.

[00033] A **FIG. 10** é um gráfico que mostra as contagens bacterianas de MRSA USA 400 após ensaio de placa de 24 h de BM3103 em uma formulação de Transcutol.

[00034] A **FIG. 11** é um gráfico de contagens bacterianas de *A. baumanni* após ensaio de placa de 24 h de BM3103 em uma formulação de Transcutol.

[00035] As **FIGS. 12A-12D** são imagens que mostram os resultados de um ensaio de inibição de biofilme de MRSA USA 400

[00036] A **FIG. 13** é uma série de imagens mostrando que o tratamento com BM3103 de MRSA USA 400 induz a morte celular como demonstrado por coloração positiva de PI.

[00037] As **FIGS. 14A-14D** são imagens que mostram o tratamento de um biofilme MRSA USA 400 estabelecido com BM3103 por 24 h.

[00038] A **FIG. 15** é uma série de imagens mostrando que o tratamento com BM3101 de MRSA USA 400 induz a morte celular em um biofilme existente, como mostrado por coloração positiva de PI.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00039] Intervalos numéricos, medições e parâmetros usados para caracterizar a invenção - por exemplo, graus angulares, quantidades de ingredientes, pesos moleculares de polímeros, condições de reação (pH, temperaturas, níveis de carga etc.), dimensões físicas e assim por diante - são

necessariamente aproximações; e, embora relatados com a maior precisão possível, eles inerentemente contêm imprecisões derivadas de suas respectivas medições. Consequentemente, todos os números expressando intervalos de magnitudes como utilizados no relatório descritivo e reivindicações são para serem entendidos como sendo modificado em todas as instâncias pelo termo "a cerca de". Todos os intervalos numéricos devem incluir todos os subintervalos incrementais possíveis dentro dos limites externos do intervalo. Assim, um intervalo de 30 a 90 unidades divulga, por exemplo, 35 a 50 unidades, unidades de 45 a 85 e 40 para 80 unidades, etc. A menos que definido de outra forma, as porcentagens são em % peso/vol.

[00040] Todas as patentes, pedidos de patente publicados e referências de literatura que não sejam de patentes aqui citadas são incorporadas aqui por referência na sua totalidade.

[00041] Em alguns aspectos, a invenção compreende métodos de modulação de infecção bacteriana compreendendo a administração de um único tolano, coadministração de mais de um tolano ou administração sequencial de um tolano seguida por um segundo. Os compostos de tolano são descritos em mais detalhes nas seções abaixo. Eles podem ser administrados sequencialmente ou concomitantemente. Os compostos podem ser administrados de uma vez ao dia até cerca de 6 vezes por dia, dependendo dos excipientes da formulação. As vias de administração incluem tópica, transdérmica, oral, nasal, oftálmica, ótica, IV, IM, subcutânea, retal e vaginal.

[00042] O uso de excipientes farmacêuticos na preparação de drogas é geralmente bem compreendido a partir de tratados farmacêuticos como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edition (1990) e suas edições subsequentes, como Remingtons: The Science and Practice of Pharmacy, 22n edition (2012). As formulações tópicas podem ser combinadas com solventes, emulsificantes, emolientes, solventes etc. em soluções, suspensões, cremes, pomadas e hidrogéis, entre outros (Handbook of Formulating Dermal Application,

Nava Dayan, 2016; Topical Drug Delivery Formulations, David Osborne & Anton Amann, 1989).

[00043] Em certas modalidades, a invenção envolve uma formulação contendo uma base percentual em peso, o ingrediente ativo (composto de tolano) pode compreender de cerca de 0,01% a cerca de 30% da formulação. Em certas modalidades, o ingrediente ativo (tolano) pode compreender de cerca de 0,1% a cerca de 25% da formulação. Idealmente, a dosagem do antibiótico está entre 0,1 e 20%.

[00044] *Definições químicas e biológicas*

[00045] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos neste documento têm o mesmo significado que tão comumente compreendido por um versado comum na técnica ao qual pertence a invenção. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são aqui descritos. Todas as referências aqui citadas, incluindo livros, artigos de periódicos, pedidos de patentes publicados nos EUA ou no estrangeiro, patentes americanas ou estrangeiras emitidas e quaisquer outras referências são incorporadas por referência em sua totalidade, incluindo todos os dados, tabelas, figuras e texto apresentados nas referências citadas.

[00046] Os termos a seguir usados ao longo deste pedido têm os significados descritos abaixo.

[00047] Conforme utilizado no presente documento, o termo "-(C_1-C_6)alquil" refere-se a hidrocarbonetos saturados não cíclicos de cadeia linear e ramificada com 1 a 6 átomos de carbono. Os grupos representativos de —(C_1-C_6)alquil de cadeia linear incluem metil, -etil, -n-propil, -n-butil, -n-pentil e -n-hexil. Os grupos representativos —(C_1-C_6)alquil de cadeia linear incluem isopropil, sec-butil, isobutil, terc-butil, isopentil, neopentil, 1-metilbutil, 2-metilbutil, 3-metilbutil, 1,1-dimetilpropil e 1,2-dimetilpropil, metilpentil, 2-metilpentil, 3-metilpentil, 4-

metilpentil, 1-etilbutil, 2-etilbutil, 3-etilbutil, 1,1-dimetilbutil, 1,2-dimetilbutil, 1,3-dimetilbutil, 2,2-dimetilbutil, 2,3-dimetilbutil, 3,3-dimetilbutil e semelhantes. De maneira mais geral, o índice subscrito refere-se ao número de átomos de carbono na cadeia. Assim, o termo "-(C_1-C_3)alquil" refere-se a hidrocarbonetos saturados não cíclicos de cadeia linear e ramificada com 1 a 3 átomos de carbono.

[00048] Conforme utilizado no presente documento, "-(C_1-C_6)alcoxi"significa um hidrocarboneto não cíclico de cadeia linear ou ramificada com um ou mais grupos éter e de 1 a 6 átomos de carbono. Os (C_1-C_6)alcoxis de cadeia linear e ramificada representativos incluem -metoxi, -etoxi, -propoxi, -butiloxi, -pentiloxi, -hexiloxi, - metoximetil, -2-metoxietil, -5-metoxipentil, -3-etoxibutil e semelhantes. E “-(C_1-C_3)alcoxi” é definido da mesma forma, exceto com apenas 1 a 3 carbonos.

[00049] Conforme utilizado no presente documento, "-(C_1-C_6)RH", em que R é O ou S significa um álcool não cíclico de cadeia linear ou ramificada ou hidrocarboneto de tiol com um ou mais grupos hidroxil ou tiol e de 1 a 6 átomos de carbono. -(C_1-C_6)RH de cadeia linear e ramificada representativo incluem -metanol, metanotiol, etanol, etanotiol, n-propanol, isosropanol, n-propanotiol e semelhantes. E “-(C_1-C_3)RH” é definido da mesma forma, exceto com apenas 1 a 3 carbonos.

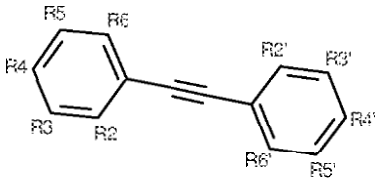
[00050] Conforme utilizado neste documento, os termos "halo" e "halogênio" se referem a fluoro, cloro, bromo ou iodo.

[00051] Conforme utilizado neste documento, "halo-alquil" ou "$(halo)_p$(C_1-C_6)alquil-" significa uma cadeia alquil (C_1-C_6) substituída por halo nos locais p, onde p é 1, 2 ou 3. Os substituintes halo podem ser substituídos no mesmo carbono ou em um carbono diferente no (C_1-C_6)alquil. Grupos "$(halo)_p$(C_1-C_6)alquil-" representativos incluem, por exemplo, CF_3, -CH_2CHF_2, -$CH_2CH_2CH_2Cl$, -$CHBr_2$, -CHBrCl, -CHCFCl, -CH_2CHI_2, -$CH_2CH_2CHClCH_2Br$, e semelhantes.

[00052] Em algumas modalidades, existem dois anéis fenil mostrados em uma estrutura e contendo os substituintes R^1 e R^2. Em certas modalidades, existem de um a três substituintes R^1 e de um a três substituintes R^2 nos anéis fenil. Em algumas modalidades, a posição de R^1 e/ou R^2 nos anéis fenil está principalmente nas posições *para* e *meta*, ou seja, na posição 3, 4 ou 5 em um anel fenil e nas posições 3', 4' e 5' no outro anel fenil, embora também seja possível ter substituintes na posição *orto* (2, 2', 6 e 6'). Pode haver um, dois ou três substituintes R^1 no primeiro anel fenil e, correspondentemente, de um a três substituintes R^2 no segundo anel fenil. Todas as permutações dentro delas são possíveis, por exemplo: um R^1 e um R^2; dois R^1 e dois R^2; três R^1 e três R^2; um R^1 e dois R^2; um R^1 e três R^2; dois R^1 e um R^2; dois R^1 e dois R^2; dois R^1 e três R^2; três R^1 e um R^2; ou três R^1 e dois R^2. Cada R^{1-2} é selecionado independentemente e quando dois ou mais estão presentes, eles podem ser iguais ou diferentes. Em outras palavras, cada ocorrência de R^1 pode ser igual ou diferente de outro R^1 ou R^2; e cada ocorrência de R^2 pode ser igual ou diferente de outro R^2 ou R^1.

[00053] De acordo com a presente divulgação, exemplos não limitativos de alguns compostos antimicrobianos de tolano substituídos específicos são dados na Tabela A.

[00054] Tabela A: Compostos antimicrobianos de tolan substituídos representativos.

	A natureza e a(s) posição(ões) dos substituintes R1 e R2
Núcleo de tolano	

Hidróxi	3,5- di-hidroxitolano; 3,4- di-hidroxitolano; 3,4,5-tri-hidroxitolano; 3,3’,4,5’-tetra-hidroxitolano; 3,3’,4,4’-tetra-hidroxitolano; 4 3,4,4'- tri-hidroxitolano; 3,3',4’- tri-hidroxitolan; 2,4,4'-tri-hidroxitolano; 2,4,2',4'-tetra-hidroxitolano;
Tiol	3,5-di-hidroxi-4’-tioltolano; 3,4-di-hidroxi-4’-tioltolano; 4,5-di-hidroxi-4’-tioltolano; 3,4,5-tri-hidroxi-4’-tioltolano; 3,4'-ditiol-tolano; 4,4'-ditiol-tolano;
Glicosídeos e misturado	3,5'-di-hidroxi-4'-metoxitolano 5-O-β-D-glicosídeo; 3’,4’-di-hidroxi-3-metoxitolano-5-O-β-D-glicosídeo; 3,4’-di-hidroxitolano 5-O-β-D-glicosídeo; 2,3-di-hidroxi-4’-metoxitolano 5-O-β-D-glicosídeo; 2,3,3’-tri-hidroxi-4’-metoxitolano 5-O-β-D-glicosídeo;
Haloalquil	4-hidroxi-4 '-(trifluoro)metiltolano **(BM3213);**
Alcoxi (O-alquil) e misturado	3,5,4'-trimetoxitolano; 3,4,4'-trimetoxitolano **(BM3303);** 4,5,4'-trimetoxitolano; 3,4,5,4'-tetrametoxitolano; 4'-hidroxi-3,5-dimetoxitolano; 4'-hidroxi-3,4-dimetoxitolano; 4'-hidroxi-4,5-dimetoxitolano; 4'-hidroxi-3,4,5-trimetoxitolano; 3,5-di-hidroxi-4'-metoxitolano; 4,4'-dimetoxitolano; 3,5,3'-tril-hidroxi-4'-metoxitolano; 4,4'-di-hidroxi-3-metoxitolano; 3,4-di-hidroxi-4'-metoxitolano; 3,4-dimetoxitolano; 3,4'-dimetoxitolano; 4-hidroxi-4'-metoxitolano **(BM3103);**
Álcool e	33,5-di-hidroxi-4'-metanoltolano; 3,4-di-hidroxi-4'-etanoltolano;

Tiol e misturado	4,5-dimetanol-4'-tioltolano; 3,5-dietanol-4'-metanoltolano; 3,5-dimetiltiol-4'-hidroxitolano; 3,4-di-hidroxi-4'-etitioliolol; 4,5-di-hidroxi-4'-propiltioltolano; 3,5-dimetiltiol-4'-metoxitolano; 3,4'-dimetiltiol-tolano; 4, 4'-dimetiltiol-tolano

[00055] Pode-se observar que os compostos de tolano descritos acima são geralmente polares e possuem certos substituintes eletronegativos (por exemplo, -OH, $-OCH_3$, -halo, etc.) nas extremidades respectivas. Embora isso não seja essencial, pode ser desejável prever um comportamento semelhante ao cristal líquido para as moléculas assumirem uma estrutura liotrófica ou parcialmente ordenada em estado de solução. Sem desejar estar vinculado à teoria, acredita-se que isso possa facilitar sua capacidade de penetrar e interromper biofilmes bacterianos de natureza cristalina líquida. Esses compostos atuam isoladamente e em combinações para impedir a colonização microbiana de uma planta, animal, humano ou superfície física onde bactérias ou outros micróbios podem aderir e colonizar. A invenção descreve ainda o uso desses compostos a serem formulados em sprays, revestimentos, micelas, lipossomas, géis, sabões, espumas ou cremes para prevenir ou tratar uma infecção bacteriana.

[00056] Os compostos de tolano, também aqui referidos como compostos de tolano substituídos, também incluem sais dos compostos identificados acima. Os compostos de tolano, especialmente aqueles compostos mono ou poli-hidroxilados, liberam facilmente um ou mais prótons, dependendo do pH, para formar ânions. Tais ânions podem ser combinados com cátions, como os cátions mono, di e trivalentes para formar sais. Para cátions monovalentes (M^+), um único tolano é ligado para formar sais de M^+ tolano. Da mesma forma, para um cátion divalente (M^{2+}), duas moléculas de tolano são ligadas para formar sais de $M^+(tolano)_2$; e para um cátion trivalente (M^{3+}), três moléculas de tolano são ligadas para formar sais de $M^+(tolano)_3$. Os sais são frequentemente facilmente

solúveis em meio aquoso, o que pode facilitar formulações. Cátions ilustrativos, mas não limitativos, para a formação de sal de tolano incluem: Na^+ ou K^+, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Cu^+, $Cu^{2+}Fe^{2+}$ e Fe^{3+}.O-glicosídeos podem ser formados de maneira semelhante.

[00057] *Utilidade de tolanos antimicrobianos para desinfetar ou higienizar uma superfície*

[00058] Um tolano substituído representativo, 4-hidroxi-4'-metoxitolano (BM3103), demonstrou ser útil para controlar o crescimento microbiano. Verificou-se que o BM3103 era eficaz contra o tipo selvagem *E.Coli*. onde dados anteriores mostraram que o 3,5,4'-tri-hidroxitolano é ineficaz. Também foi demonstrado que o BM3103 perturba a formação do gramado bacteriano ou biofilme. Além disso, o BM3103 demonstrou possuir atividade antimicrobiana significativa contra uma série de micro-organismos. Além disso, o BM3103 e seus tolanos substituídos relacionados possuem baixa toxicidade tópica e têm ampla segurança na pele humana e animal. Isso permite que eles sejam utilizados em formulações de produtos com um amplo perfil de segurança. Além disso, eles podem ser formulados com outros componentes para fornecer produtos finais com propriedades antimicrobianas.

[00059] Os tolanos substituídos por atividade antimicrobiana podem ser formulados e empregados como desinfetantes e utilizados em superfícies físicas ou biológicas. Conforme utilizado no presente documento, "micróbios" é um termo amplo que abrange patógenos de todas as classificações, incluindo, em particular, bactérias e fungos (incluindo suas formas filamentosas e leveduras). As bactérias incluem os tipos de coloração Gram-negativa e Gram-positiva, bem como a morfologia da haste e dos bacilos. Patógenos bacterianos e fúngicos importantes e as aplicações em que podem ser encontrados incluem os identificados na Tabela B.

[00060] Tabela B - Micróbios patogênicos selecionados

Micro-organismos relevantes para várias aplicações	
Micro-organismo	**Aplicação potencial**
Fungos	
Aspergillis Niger, Aspergillius flavus, Aspergillius parasiticus, Aspergillius oryzae, Aspergillius sp., Cladosporium, Penicillium chrysogenum, Margarinomyces fasciculatis, Stemphylium congestum, Trichiderma viride	**Formação de lodo**
Dermatophytic Fungi: Epidermophytum sp., Microsporum sp., Tricophytum sp.	**Cosméticos** **Produtos de cuidado pessoal** **Produtos de cuidados com a pele**
Spoilage fungi: Aspergillus sp., Candida sp., Penicilliumm sp. Alicyclobacillus sp.,	**Cosméticos**
Candida albicans, other Candida sp., Pullulaeria pullelelus, Rhotorula sp., and Saccharomyces sp. Pityrosporum ovale	**Produtos de consumo** **Produtos de cuidado pessoal**
Bactérias	
Acremonium strictum, Bacillus sp., Citrobacter freundii, E. Coli, Fusarium solani, Geotrichum candidum, Penicillium sp., proteus mirabilis, Pseudomonas sp., Pseudomonas stuizeri	**Produtos de consumo**
Bactéria Gram-positiva: Corynebacterium, Staphylococcus, Streptococcus bacillus.	**Produtos de cuidado pessoal** **Produtos de cuidados com a pele**
Bactéria Gram-negativa: E. Coli, Enterobacter aerogenes, Flavobacteria, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia marcescens.	**Produtos de cuidado pessoal** **Produtos de cuidados com a pele**

[00061] Conforme utilizado no presente documento, "antimicrobiano" é um termo amplo que abrange tanto a morte de micróbios (por exemplo, bactericida ou fungicida) quanto a inibição do crescimento de micróbios (por exemplo, bacteriostático ou fungistático). Frequentemente, em sistemas biológicos, um agente estático é suficiente para impedir o crescimento enquanto o corpo se livra do organismo infeccioso por meios naturais. Conforme utilizado no presente documento, o termo "desinfetar" significa a eliminação de muitos ou todos os micro-organismos indesejáveis (por exemplo, patogênicos) em um ambiente (por exemplo, uma superfície). Conforme utilizado no presente documento, o termo "higienizar" significa a redução de contaminantes no ambiente inanimado para níveis considerados seguros, de acordo com a lei de saúde pública, ou que reduz a população bacteriana em números significativos.

[00062] Dadas as propriedades do BM3103 e dos antimicrobianos de tolano substituído relacionados, os compostos podem ser usados como ingrediente

ativo ou agente auxiliar que pode ser combinado com um solvente para atingir uma concentração desejada, proporcionando ao produto final a atividade antimicrobiana, desinfetante ou higienizante desejada. Da mesma forma, os compostos podem ser combinados com componentes normalmente encontrados em produtos de consumo, como detergentes, sabões, surfactantes, emolientes e semelhantes.

[00063] Em certos aspectos, os agentes antibacterianos descritos como tolanos podem ser combinados em uma composição de um ou mais agentes antimicrobianos. Esta composição pode então ser combinada com outros ingredientes para criar um agente antimicrobiano, desinfetante ou higienizante de amplo espectro. Além disso, em certos aspectos, os agentes antibacterianos descritos como tolanos podem ser combinados com um ou mais antibióticos na mesma formulação em um tratamento combinado com múltiplas formulações. Antibióticos adequados podem incluir aminoglicosídeos, ansamicinas, carbacefemos, flagil (metronidazol), sulfato de neomicina, carbapenemos, cefalosporinas, glicopeptídeos, macrolídeos, monobactamos, penicilinas, polipeptídeos, polimixina, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas. Exemplos de antibióticos adequados incluem, mas não estão limitados a: clindamicina, tigeciclina, vancomicina, ciprofloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol, trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina, penicilina V, penicilina G, procaína penicilina, benzatina, penicilina, carbencilina, mezlocilina, ampicilina, piperacilina, arsfenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina (rifampina nos EUA), tianfenicol, timidazol, dapsona, lofazimina, bacampicilina, tiearcilina, ticarcilina, piperacilina/tazobactam, aztreonam, cefotetano, loracarbef, mefoxina, merrem, levofloxacina, lomefioxacina,primaxim, cicloserina, canamicina, dicloxacilina, democlociclina, minociclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tobramicina,

gentamicina, neomicina, amicacina, craramieína, nebina, eritromicina/sulfisoxazol, netromicina, estreptomicina, tobramicina, cefotaxima, cefuroxima, cetamina, cefazolina, cefibuteno, cefizoxima, cefaclor, cefopoerazona, cefprozil, mono-hidrato de cefadroxil, ceftazidima, trimetoprim/sulfametoxazol, cefalexina, cefazolina, nafato de cefamandol, cefepima, cefonicida, sulfadiazina, norfloxacina, enoxacina, cefdinir, seromicina, ceftriaxona, cefixima, ceftazidima, claritromicina, diritromicina, metenamina, etionamida, trovafioxacina, esparfloxacina, interfon-α, indinavir, ganciclovir, foscamet, lamivudina, famciclovir, rimantadina, zalcitabina, interferon-β, saquinavir, ritonavir, ribavirina, eritromicina, troleandomicina, azitromicina, elidamicina, colistina, anfotericina B, flucitosina, fluconazol, griseofulvina, grepafloxacina, ultramicrosize griseofulvina, terbinafina, cetoconazol, clotrimazol, dapsona, delavirdina, ziduvudina, amantadina, palivizumabe, valaciclovir, didanosina, nelfinavir, nevirapina, ribavirina, cidofovir, pirimetamina, metronidazol, furazolidona, atovaquona, estavudina, lamiduvina, aciclovir, mionazol, itraconazol, cloroquina, pirimetamina, mefloquina, hidroxicloroquina, capreomicina, permetrina, crotamiton, lindano, fluorouracil, etambutol, rifabutina, isoniazida, ácido aminosalicíclico, rifapentina, pirazinamida, peróxido de benzoil, gluconato de clorexidina, oxiclorosseno de sódio, peróxido de benzoil, rifampicina, rifampicina/isoniazida, rifampicina/isoniazida/pirazinamida, nitrofurantoína, linezolida, nitrofurantoína, fosfomicina, ácido nalidíxico, atropina, oxitetraciclina/sulfametizol/fenazopiridina, cloranfenicol, neomicina/polimixina, tfimetorpim/polimixina, tobramicina/dexametasona, vidatabina, ciprofloxacina, ofioxacina, sulfacetamida, povidoneodina, gentamicina, nistatina, cloranfenicol, bacitracina, sulconazol, terbinafina, tetraclorossalicilanilida, metronidazol, metromdazol, ciclopiroxolamina, clotrimazol, clotrimazol/betametasona, butenafina, clotrimazol, natifina, oxiconazol, selênio, econazol, penciclovir ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Um tratamento combinado pode envolver a administração simultânea do composto de tolano e do antibiótico, ou

pode envolver a administração sequencial do composto de tolano e do antibiótico.

[00064] Além disso, a invenção fornece um método de tratamento de uma superfície em que a composição de tratamento de superfície é um agente antimicrobiano, desinfetante ou higienizante substancialmente livre de fenol, onde o agente antimicrobiano está presente em uma quantidade suficiente para controlar o crescimento microbiano.

[00065] Em alguns aspectos, a atividade de amplo espectro dos agentes antimicrobianos aqui descritos pode funcionar para reduzir a probabilidade de formação de biofilme e/ou trabalhar para interromper biofilmes em vários estados de formação. Os micro-organismos formam biofilmes em superfícies biológicas e não biológicas, proporcionando uma forte vantagem ecológica. Geralmente, a formação de biofilme fornece uma existência protegida alternativa para organismos microbianos. Dentro do biofilme totalmente formado, as bactérias são protegidas por uma matriz extracelular autoproduzida, responsável por noventa por cento da biomassa. Uma vez formado, o biofilme fornece um abrigo hidratado e de alta resistência à tração, permitindo a troca de material genético. O biofilme também oferece proteção contra dessecação, predação, oxidação, radiação e penetração de antibióticos, desinfetantes ou higienizantes. Uma revisão sobre biofilmes, Kostakioti M., et al. (2013) *Bacterial Biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Apr 1;3(4): a010306. é aqui incorporado na sua totalidade. A matriz extracelular produzida por bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* se auto-organiza em uma matriz cristalina líquida através de interações entrópicas entre polímeros e bacteriófagos filamentosos de Pf, que são filamentos longos carregados negativamente. Esta estrutura cristalina líquida melhora a função do biofilme, aumentando a adesão e a tolerância à dessecação e antibióticos (Secor, PR et. Al. (2015). Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function.

Cell Host Microbe. November 11; 18(5): 549-559.).

[00066] Os tolanos podem ser sintetizados utilizando os procedimentos gerais descritos na Patente US 6.599.945 B2 de Docherty & Tsai, aqui incorporada por referência para todos os fins. Outros métodos de sintetizar compostos de tolano podem ser possíveis e estão totalmente abrangidos na presente divulgação.

[00067] *Exemplos*

[00068] *Exemplos 1-5: Ensaio de formação de colônias em escala de doses*

[00069] Uma série de ensaios de determinação da faixa de dose foi realizada com cinco cepas bacterianas, *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA1535 e *E.Coli*. WP2 uvrA pKM101, com e sem ativação metabólica em três placas por dose. As seguintes doses, juntamente com os controles positivo e negativo, foram testadas: 5.000, 2.500, 1.250, 500, 250, 125,50, 20, 10,5, 2, 1 e 0,2 µg/placa. As placas foram avaliadas quanto à toxicidade (uma diminuição na contagem de placas com o aumento da dose e/ou um afinamento visível do gramado de fundo) e a precipitação do artigo de teste. A ativação metabólica foi incluída em algumas amostras pela adição de frações S9 de fígado de rato induzidas por fenobarbital/benzoflavona com cofatores (mistura S9). Antes do uso, alíquotas recém-descongeladas do fígado de rato S9 foram misturadas com uma mistura estéril de cofator. A mistura S9 contém uma concentração de S9 no fígado a 10% e foi refrigerada ou armazenada em gelo até ser utilizada. Ao testar com ativação metabólica, a mistura S9 foi usada no tubo de ensaio no lugar do tampão fosfato.

[00070] As formulações de dosagem foram preparadas para distribuir todas as doses em um volume constante de 0,1 mL. A dose mais alta foi preparada a partir do artigo de teste pesado até 0,1 mg mais próximo e as formulações restantes foram preparadas como diluições em série a partir da formulação de estoque de alta dose. Usando uma caneta de marcação permanente ou etiquetas impressas em computador, as placas de ensaio foram rotuladas com o projeto e

os números do estudo e a data. As placas e os tubos de ensaio foram marcados com um identificador único, que foi usado para combinar os tubos de ensaio com a placa de ágar de glicose mínima adequadamente identificada.

[00071] O método de pré-incubação foi utilizado para realizar o ensaio. A mistura de ensaio consistiu em 0,1 mL da formulação do artigo de teste ou artigo de controle, 0,5 mL de mistura S9 ou tampão fosfato e 0,1 mL de cultura bacteriana. Os tubos de ensaio foram incubados a 37±1°C com agitação suave por 20±1 minutos, em seguida foram adicionados 2,0-2,5 mL de ágar superior à mistura de ensaio e a mistura superior de ágar/ensaio foi derramada em placas de ágar de glicose mínimas apropriadamente marcadas. Uma vez que o ágar superior endureceu, as placas foram invertidas e incubadas a 37±1°C por 48±2 horas. As placas foram contadas com o Sistema Sorcerer (v. 2.2) / Ames Study Manager (v. 1.2.4) da Perceptive Instruments (Suffolk, Reino Unido). Com esse sistema, as contagens de placas são transferidas automaticamente do imageador de placas (Sorcerer) para uma planilha do Study Manager e os dados são armazenados de maneira segura em um banco de dados Oracle. Algumas placas foram contadas manualmente, por exemplo, se o precipitado da amostra interferir na contagem automática ou nos resultados de toxicidade na formação de microcolônias; nesse caso, as contagens dessas placas foram inseridas manualmente na planilha. As placas foram pontuadas também com a extensão da colonização por um código pós-correção. Os dados estão nas Tabelas 1-5, abaixo. As abreviações usadas nas tabelas são:

Controles positivos			Códigos de placa Postfix	
NaN_3	Azida de sódio		A	Gramado ausente
BAP_Moltox	Benzo (a) pireno_Moltox		E	Gramado intensificado
4NQO	N-óxido de 4-nitroquinolina		P	Precipitado

2A	2-Aminoantraceno		S	Gramado escasso
	Etanol		T	Toxicidade
			#	(por exemplo, 0, 6, 56, etc. contagens)

[00072] Tabela 1 - Cepa TA97a com ativação metabólica.

Cepa	Composto	Nível de dose/ placa	Unidades formadoras de colônias/placa	Contagens de colônias individuais
TA97a	BM3103	5000 µg	*0.0*	0 P
		2500 µg	*0.0*	0 A P
		1250 µg	*0.0*	0 A P
		500 µg	*0.0*	0 A
		250 µg	*0.0*	0 A
		125 µg	*0.0*	0 A
		50 µg	*0.0*	0
		20 µg	*0.0*	0 A
		10µg	*77.0*	77.0
		5µg	*78.0*	78
		2µg	*78.0*	78
		1µg	*122.0*	122
		0.2µg	*89.0*	89
	Etanol		*101.7*	100, 94, 111
	2A	2.5 µg	3241.3	3115, 3093, 3516

[00073] Tabela 2 - Cepa TA100 com ativação metabólica

Cepa	Composto	Nível de dose /placa	Unidades formadoras de colônias/placa	Contagens de colônias individuais
TA100	BM3103	5000 µg	*0.0*	0 A P
		2500 µg	*0.0*	0 A P
		1250 µg	*0.0*	0 A P
		500 µg	*0.0*	0 A
		250 µg	*0.0*	0 A
		125 µg	*0.0*	0 A
		50 µg	*0.0*	0 A
		20 µg	*54.0*	54
		10µg	*38.0*	38 S T
		5µg	*74.0*	74
		2µg	*36.0*	36 T
		1µg	*56.0*	56
		0.2µg	*78*	78
	Etanol		*75.7*	69,84,74
	BAP_Moltox	2 µg	806.0	703, 721, 994

[00074] Tabela 3 - Cepa TA98 com ativação metabólica

Cepa	Composto	Nível de dose /placa	Unidades formadoras de colônia/placa	Contagens de colônias individuais
TA98	BM3103	5000 µg	*0.0*	0 A P
		2500 µg	*0.0*	0 A P
		1250 µg	*0.0*	0 A P
		500 µg	*0.0*	0 A P
		250 µg	*0.0*	0 A
		125 µg	*0.0*	0 A
		50 µg	*0.0*	0 A
		20 µg	*0.0*	0 A
		10µg	*16.0*	16 E
		5µg	*16.0*	16
		2µg	*18.0*	18
		1µg	*8.0*	8
	Etanol		*16.7*	16,22,12
	2A	2 µg	2315.0	2664, 1955, 2326

[00075] Tabela 4 - Cepa TA1535 sem ativação metabólica

Cepa	Composto	Nível de dose/ placa	Unidades formadoras de colônia/placa	Contagens de colônias individuais
TA1535	BM3103	5000 µg	*0.0*	0 A P
		2500 µg	*0.0*	0 A P
		1250 µg	*0.0*	0 A P
		500 µg	*0.0*	0 A
		250 µg	*0.0*	0 A
		125 µg	*0.0*	0 A
		50 µg	*0.0*	0 A
		20 µg	*0.0*	0 A
		10 µg	*0.0*	0 A T
		5 µg	*6.0*	6
		2 µg	*10.0*	10
		1 µg	*11.0*	11
		0.2 µg	*12.0*	12
	Etanol		*11.7*	14, 9, 12
	NaN3	1 µg	714.7	661, 702, 781

[00076] Tabela 5 - Cepa WP2 uvrA pkM101 sem ativação metabólica

Cepa	Composto	Nível de dose/ placa	Unidades formadoras de colônia/placa	Contagens de colônias individuais
WP2 uvrA pkM101	BM3103	5000 µg	*0.0*	0 A P
		2500 µg	*0.0*	0 A P
		1250 µg	*0.0*	0 A
		500 µg	*0.0*	0 A P
		250 µg	*0.0*	0 A P
		125 µg	*0.0*	0
		50 µg	*14.0*	14
		20 µg	*138.0*	138
	Etanol		*151.0*	153, 142, 158
	4NQO	0.25 µg	2950.3	2987, 2951, 2913

[00077] *Exemplos 6-9: Ensaio de formação de colônias bacterianas:*

[00078] E. Coli competente para NEB 5 α foram recuperadas de culturas congeladas e cultivadas durante a noite em uma incubadora bacteriana a 37°C. As culturas proliferativas de bactérias foram usadas em um ensaio de formação de colônias adicionando 25 µL de bactérias da cultura noturna a 10 mL de Caldo Lysogeny fresco (LB; Bertani, G. (2004). *“Lysogeny at mid-twentieth century: p1,*

P2 and other experimental systems". *Journal of Bacteriology*. ***186*** (3): 595-600. PMC 321500. PMID 14729683. Doi: 10.1128/jb.186.3.595-600.2004). Foi adicionado 1 mL desta bactéria diluída a várias diluições de formulações de compostos de tolano substituídos, como descrito na Tabela C, abaixo e em gráficos das Figuras correspondentes.

[00079] Tabela C: Formulações de compostos de tolano

Exemplo	Composto de tolano*	Formulação	Figura de dados
6	BM3103	30% de PEG-400 e até 28% de HPβCD (hidroxipropil-β-ciclodextrina) em água com diluições em série do composto BM3103 misturadas em 70% volume / volume de álcool gel	1
7	BM3103	70% volume / volume de álcool gel	2
8	BM3213	70% volume / volume de álcool gel	3
9	BM3303	70% volume / volume de álcool gel	4

*Consulte a Tabela A para identificação do composto

[00080] Um mL de cada formulação foi misturado com 1 mL de bactérias diluídas em LB e colocado em placas de ágar. Os géis de álcool foram deixados secar e incubados durante a noite durante 16-18 horas. As placas de controle consistiam em 2 mL de álcool gel mais 1 mL de bactérias diluídas, resultando em uma contagem de colônias com menos de 10 colônias, um 1 mL de álcool gel mais 1 mL de bactérias diluídas, resultando em um gramado parcial de bactérias (as colônias estavam muito próximas da contagem apropriadamente), 1 mL de bactérias diluídas isoladamente, resultando em um gramado completo de bactérias (sem colônias distinguíveis) e uma diluição apropriada de PEG-400 e HPβCD em 1 mL de álcool gel mais 1 mL de bactérias diluídas, resultando em um gramado de bactérias. A área da placa foi então selecionada e o contador de

colônias Image J foi utilizado para obter contagens de colônias (Tamanho (pixels ao quadrado) 5-1000 e circularidade 0,5-1).

[00081] Como visto na **FIG. 1**, uma diluição de 280 µM (62,5 µg/mL) de BM3103 reduziu a contagem de colônia de *E. Coli*. consideravelmente e a diluição de 557 µM (125 µg/mL) reduziu ainda mais a colonização. A **FIG. 2** mostra que as formulações de álcool em álcool gel de BM3103 em concentrações de 2,23 mM (500 µg/mL) e 4,45 mM (1000 µg/mL) inibiram completamente o crescimento de *E. Coli*. Na **FIG. 3**, o BM3213 em álcool gel era muito inibitório para *E.Coli* em concentrações de 2,23 mM, mas menos em concentrações 10 vezes diluídas. Finalmente, o BM3303 em álcool gel mostrou efeitos inibitórios dependentes da dose. A **FIG. 4** mostra que o BM3303 em álcool gel era um inibidor de *E.Coli* em concentrações de 1,11 mM, mas menos em concentrações 10 vezes diluídas. Finalmente, o BM3303 em álcool gel mostrou efeitos inibitórios dependentes da dose.

[00082] *Exemplos 10-12: MRSA, Pseudomonas aeruginosa e Candida albicans*

[00083] *Materiais*

[00084] Uma cultura fresca de isolado patogênico foi usada nesses exemplos. As cepas bacterianas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA USA 300), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27312 e *Candida albicans* ATCC 64550.

[00085] A FIG. 5 ilustra o método da placa de propagação usado nesses exemplos. Em suma, foram feitas placas de ágar, as bactérias foram diluídas para 10^6 ou 10^8 CFU/mL, as bactérias e a droga foram misturados e depois plaqueados. Os grânulos de propagação de vidro foram usados porque proporcionam uma melhor propagação bacteriana. As placas foram incubadas por 24 horas e depois as colônias que se formaram foram contadas.

[00086] As culturas proliferativas de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA, USA 300) foram usadas em um ensaio de formação de

colônias. A cultura de bactéria liofilizada de MRSA foi recuperada com uma área de crescimento de 3 cm de diâmetro e ressuspensa para obter uma suspensão final de inóculo de aproximadamente 10^8 CFU/mL. A concentração foi confirmada usando medições históricas de densidade óptica. O composto total BM3103 foi suspenso em uma formulação de álcool gel a 70% v/v (Formulação A) antes da introdução de bactérias, com o veículo consistindo apenas em álcool gel a 70% v/v. O MRSA a 10^8 CFU/mL foi desafiado com partes iguais de uma dose alta, média e baixa de BM3103, formulação de veículo, controle positivo (Tobramicina, 600 µg/mL) ou controle não tratado (solução salina tamponada com fosfato). O inóculo foi plaqueado em placas Tryptic Soy Broth a 37°C por 24 h. As placas foram fotografadas e contadas. O tratamento para cada experimento foi realizado em triplicado e o experimento foi repetido três vezes, para um total de 9 placas por grupo.

[00087] As contagens de colônias para cada tratamento foram tabuladas e o Log das unidades formadoras de colônias/mL (Log CFU/mL) foi determinado. A média e o desvio padrão do Log CFU/mL foram calculados para cada tratamento. Uma análise de variância unidirecional foi realizada com um intervalo de confiança de 95%.Como visto nas **FIGS. 6A-6B**, o controle positivo de Tobramicina reduziu em 6 vezes de redução as contagens de MRSA USA 300 quando comparado ao controle não tratado. A baixa dose de BM3103 (0,05% p/v, 2 mM) reduziu significativamente as contagens em mais de 6 vezes quando comparado ao veículo (35% v/v, álcool) e controles não tratados. A dose média (0,25% p/v, 11 mM) reduziu a contagem significativamente em 7 vezes, em comparação com o veículo e o controle não tratado, e a alta dose de BM3103 (0,5% p/v, 22 mM) reduziu as contagens de MRSA USA 300 completamente aproximadamente 8 vezes. Todas as três doses de BM3103 mostraram uma redução significativamente maior na contagem de MRSA USA 300 quando comparadas ao controle positivo e mostraram um efeito inibitório dependente da dose.

[00088] As culturas proliferativas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA, ATCC 27312) e *Candida albicans* (CA, ATCC 64550) foram usadas em um ensaio de formação de colônias. As culturas de bactérias liofilizadas foram recuperadas com uma área de crescimento de 3 cm de diâmetro e ressuspensa para obter uma suspensão final de inóculo de aproximadamente 10^6 CFU/mL. A concentração foi confirmada usando medições históricas de densidade óptica. Antes do desafio das bactérias, o composto de tolano BM3103 foi suspenso em 100% de éter dietilenoglicol monoetílico (Formulação C) com o controle do veículo consistindo apenas no éter dietilenoglicol monoetílico. Antes do plaqueamento, 100 µL do inóculo final (106 CFU/mL) foram misturados com 200 µL de caldo LB e 200 µL de doses de BM3103, veículo, controle positivo (Tobramicina, 12 µg/mL para PA e 160 µg/mL para CA) ou controle não tratado (solução salina tamponada com fosfato). A concentração final de plaqueamento para as doses alta, média e baixa de BM3103 foi de 0,5%, 0,25% e 0,1% p/v (22 mM, 11 mM e 4 mM), respectivamente. O inóculo foi plaqueado em ágar com suplemento de centrimida e nalidixato (CN) para PA (embora também pudesse ser usado nalidixato de sódio ou ácido nalíxico), e em placas de caldo de soja tríptico para experimentos de CA, a 37°C por 24 h. As placas foram fotografadas e contadas. O experimento foi realizado em triplicado.

[00089] As contagens de colônias para cada tratamento foram tabuladas e o Log das unidades formadoras de colônias/mL (Log CFU/mL) foi determinado. A média e o desvio padrão do Log CFU/mL foram calculados para cada tratamento. A **FIG. 7** mostra as contagens bacterianas de Log CFU/mL de PA. Não foram encontradas colônias de bactérias de PA nas placas de alta dose, BM3103 (0,5% p/v, 22 mM). Os grupos de dose média e baixa reduziram a contagem de PA quando comparados ao veículo, Tobramicina e grupos de controle não tratados em cerca de 5 vezes. O BM3103 mostrou um efeito inibitório dependente da dose nas contagens bacterianas de PA.

[00090] A **FIG. 8** mostra as contagens bacterianas de Log UFC/mL de CA.

Os grupos de dose média e alta reduziram a contagem de CA quando comparados ao grupo de baixa dose, veículo, Tobramicina e grupos de controle não tratados em cerca de 4 vezes.

[00091] *Exemplo 13: MRSA USA 400*

[00092] *Inóculo de MRSA*

[00093] Culturas de proliferação de Staphylococcus aureus resistente à Meticilina (MRSA, USA 400) foram utilizadas em um ensaio de formação de colônias. As culturas congeladas de MRSA USA 400 foram descongeladas e cultivadas durante a noite em caldo de soja tríptico (TSB) com agitação a 37°C. A cultura durante a noite (0,5-1,0 mL) foi adicionada a 100 mL de TSB e cultivada a 37°C com agitação e monitorada para uma densidade óptica de 0,55-0,60, a fim de obter uma suspensão final de inóculo de aproximadamente 10^8 CFU/mL.

[00094] *Formulação de álcool gel*

[00095] O BM3103 foi suspenso em uma formulação de álcool gel a 70% v/v para adquirir a % p/v desejada testada dentro do exemplo. Cada concentração foi cuidadosamente agitada em vórtex até dissolver. As concentrações iniciais testadas de BM3103 foram de 1, 0,5 e 0,1% p/v. Essas concentrações e o veículo de álcool gel foram misturados com partes iguais do inóculo de 10^8 CFU/mL para obter uma concentração final de 0,5, 0,25 e 0,05% (22 mM, 11 mM e 2 mM) de BM3103. A Tobramicina (600 µg/mL) serviu como controle positivo. As formulações de veículo e BM3103 continham concentração final correspondente de 35% v/v de álcool.

[00096] *Formulações de Transcutol*

[00097] O BM3103 foi dissolvido em Transcutol (éter dietilenoglicol monoetílico) a 2,5% p/v e agitado em vórtex até dissolução. Esta concentração foi então diluída em série para atingir as restantes concentrações testadas. Antes do plaqueamento, 100 µL do inóculo final (10^8 CFU/mL) foram misturados com 20 pL de caldo TSB e 80 µL de doses ou veículo de BM3103. A Tobramicina, 600 µg/mL, serviu como controle positivo. As concentrações finais de

revestimento para BM3103 foram de 1, 0,5, 0,25 e 0,1% p/v (44 mM, 22 mM, 11 mM, 4 mM) BM3103. As formulações de veículo e BM3103 continham concentração final correspondente de 40% v/v de Transcutol.

[00098] *Colônias de plaqueamento e contagens*

[00099] As formulações listadas acima combinadas com o inóculo de MRSA foram semeadas em placas de ágar TSB. As placas foram cultivadas a 37°C por 24 h, fotografadas, e as colônias de bactérias foram contadas. A experiência foi realizada em triplicado a cada nível de concentração descrito acima. As contagens de colônias para cada tratamento foram tabuladas e o Log das unidades formadoras de colônias/mL (Log CFU/mL) foi determinado. A média e o erro padrão da média foram calculados para cada tratamento.

[000100] Como visto na **FIG. 9**, 0,5 e 0,25% de BM3103 na formulação de álcool gel não resultou em contagens bacterianas para MRSA USA 400. O controle positivo, Tobramicina, e a dose mais baixa de BM3103 (0,05% p/v, 2 mM), reduziram significativamente as contagens em 4 vezes quando comparadas ao controle do veículo. Para a formulação de Transcutol, a **FIG. 10** mostra mais de uma redução de 5 vezes para 0,1% de BM3103. Não houve contagem bacteriana para o MRSA USA 400 para as concentrações restantes de BM3103 testadas na formulação de Transcutol.

[000101] *Exemplo 14: Inóculo de Acinetobacter baumannii*

[000102] As culturas proliferativas de *Acinetobacter baumannii* foram usadas em um ensaio de formação de colônias. As culturas de estoque congeladas de *Acinetobacter baumannii* foram descongeladas e cultivadas durante a noite em caldo de soja tríptico (TSB) com agitação a 37°C. A cultura durante a noite (0,5-1,0 mL) foi adicionada a 100 mL de TSB e cultivada a 37°C com agitação e monitorada quanto a uma densidade óptica de 0,20-0,38 para obter uma suspensão final de inóculo de aproximadamente 10^8 CFU/mL.

[000103] *Formulações de Transcutol*

[000104] O BM3103 foi dissolvido em Transcutol (éter dietilenoglicol

monoetílico) a 2,5% p/v e agitado em vórtex até dissolução. Esta concentração foi então diluída em série para atingir as restantes concentrações testadas. Antes do plaqueamento, 100 µL do inóculo final (10^8 CFU/mL) foram misturados com 20 µL de caldo TSB e 80 µL de doses ou veículo de BM3103. A Tobramicina, 600 µg/mL, serviu como controle positivo. As concentrações finais de revestimento para BM3103 foram de 1, 0,5, 0,25 e 0,1% p/v (44 mM, 22 mM, 11 mM, 4 mM) BM3103. As formulações de veículo e BM3103 continham concentração final correspondente de 40% v/v de Transcutol.

[000105] *Colônias de plaqueamento e contagens*

[000106] As formulações de Transcutol combinadas com o inóculo foram semeadas em placas de ágar de TSB. As placas foram cultivadas a 37°C por 24 h, fotografadas, e as colônias de bactérias foram contadas. A experiência foi realizada quatro vezes em cada nível de concentração descrito acima. As contagens de colônias para cada tratamento foram tabuladas e o Log das unidades formadoras de colônias/mL (Log CFU/mL) foi determinado. A média e o erro padrão da média foram calculados para cada tratamento.

[000107] Como mostrado na **FIG. 11**, a menor concentração testada de BM3103 a 0,1% não resultou em redução da *Acinetobacter baumannii*. Uma ligeira redução nas contagens bacterianas foi observada em 0,25% de BM3103. O BM3103 a 0,5% resultou em uma redução de 4 vezes nas contagens bacterianas e 1% de BM3103 resultou em uma redução quase completa da *Acinetobacter baumannii* (com apenas uma colônia presente em uma das placas testadas).

[000108] *Exemplo 15: Ensaios de formação de biofilme*

[000109] As culturas proliferativas de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA, USA 400) foram usadas em um ensaio de formação de colônias. As culturas de estoque congeladas de MRSA USA 400 foram descongeladas e cultivadas durante a noite em caldo de soja tríptico (TSB) com agitação a 37°C. A cultura durante a noite (0,5-1,0 mL) foi adicionada a 100 mL

de TSB e cultivada a 37°C com agitação e monitorada para uma densidade óptica de 0,55-0,60, a fim de obter uma suspensão final de inóculo de aproximadamente 10^8 CFU/mL.

[000110] *Prevenção de formação de biofilme*

[000111] Para o ensaio de inibição de biofilme, 100 µL de inóculo de MRSA USA 400 (10^8 CFU/mL) foram plaqueados com 100 µL de cada concentração de droga BM3103 em uma placa de 96 poços. Um estoque de 0,1 M de BM3103 foi dissolvido em etanol e diluído em série em TSB através de uma placa de 96 poços para obter concentrações finais de 1 mM a 0,002 mM. O inóculo tratado com droga cresceu durante a noite a 37°C sem agitação. Foram tiradas imagens de cada concentração e imagens representativas são mostradas nas FIGS. 12A-12D. A uma concentração de 0,625 mM, o BM3103 inibe completamente a formação de biofilme do MRSA USA 400 (**FIG. 12A**). A formação de biofilme leve está presente em BM3103 0,008 mM (FIG. 12B). Em concentrações de cerca de 0,002 mM, BM3103 não tem efeito na formação de biofilme de MRSA USA 400 e é comparável aos poços de controle que não foram tratados com BM3103 (FIGS. 12C-12D). No geral, o BM3103 inibe completamente a formação de biofilme em concentrações acima de 0,0625 mM e reduz a formação de biofilme em concentrações entre 0,03125 mM e 0,008 mM.

[000112] *Morte celular bacteriana*

[000113] Para confirmar que o tratamento com BM3103 induziu a morte celular bacteriana por MRSA USA 400, as células não tratadas e as células tratadas com BM3103 foram coradas com uma combinação de DAPI (mancha nuclear) e iodeto de propídio (PI, mancha morta viva). Em uma célula saudável, o PI não é capaz de atravessar a membrana celular e não produz sinal fluorescente. Se a célula estiver morta ou tiver uma membrana celular comprometida, ela se ligará ao DNA e fluorescerá entre a excitação de 535 nm e a emissão de 617 nm. O MRSA USA 400 foi plaqueado em uma placa de poço a 10^8 CFU/mL em combinação com o tratamento com BM3103 ou sem

tratamento. As placas foram colocadas a 37°C por 24 h. As células bacterianas foram co-coradas com DAPI e PI a 50 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente, por 15 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato aquecida (PBS) e mantidos em PBS durante todo o processo de aquisição de imagem. As imagens foram capturadas usando os mesmos limites de exposição para cada filtro. Nesta experiência, as células não tratadas mostraram forte coloração de DAPI com apenas leve e esparsa coloração de PI, indicando que bactérias dentro do biofilme estavam vivas **(FIG. 13)**. Após 24 horas de tratamento com BM3103, houve um aumento dependente da dose na coloração de PI de 0,002 mM a 0,0625 mM, indicando que a maioria das bactérias estava morta ou morrendo **(FIG. 13)**. Concentrações acima de 0,0625 mM deram um resultado semelhante.

[000114] *Tratamento de um biofilme existente*

[000115] Para o tratamento de biofilmes MRSA USA 400, o mesmo procedimento de ensaio em placa de 96 poços foi usado como descrito na seção de inibição de biofilme acima. No entanto, o inóculo MRSA USA 400 (10^8 CFU/mL) cresceu durante a noite a 37°C na ausência de BM3103 e sem agitação. Após 24 h de formação de biofilme, o BM3103 foi diluído em série através de uma placa de 96 poços de 1 mM a 0,002 mM. A placa foi incubada novamente durante a noite a 37°C sem agitação. Após um total de 48 h, foram obtidas imagens de cada concentração e imagens representativas são mostradas nas **FIGS. 14A-14D**. Em concentrações de 0,125 mM (**FIG. 14A**), 0,0625 mM (**FIG 14B**) ou acima, o BM3103 reduziu significativamente o biofilme de MRSA USA 400. A 0,008 mM (**FIG 14C**) ainda havia uma ligeira redução no biofilme, mas em concentrações abaixo de 0,002 mM ou em controles não tratados (**FIG 14D**), não foi observada redução no biofilme.

[000116] *Morte celular em um biofilme existente*

[000117] Para o tratamento de biofilmes MRSA USA 400, o mesmo procedimento de ensaio em placa de 96 poços foi usado como descrito na seção

de inibição de biofilme acima. No entanto, o inóculo de MRSA USA 400 (10^8 CFU/mL) cresceu durante a noite a 37°C na ausência de BM3103 e sem agitação. Após 24 h de formação de biofilme, o BM3103 foi diluído em série através de uma placa de 96 poços de 1 mM a 0,002 mM. A placa foi incubada novamente durante a noite a 37°C sem agitação.

[000118] Para confirmar que o tratamento com BM3103 induziu a morte celular bacteriana por MRSA USA 400 no biofilme existente, as células não tratadas e as células tratadas com BM3103 foram coradas com uma combinação de DAPI (mancha nuclear) e iodeto de propídio (PI, mancha morta viva) como descrito no *Exemplo 15.* O MRSA USA 400 foi plaqueado em uma placa de poço a 10^8 CFU/mL em combinação com o tratamento com BM3103 ou sem tratamento. As placas foram colocadas a 37°C por 24 h. As células bacterianas foram co-coradas com DAPI e PI a 50 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente, por 15 minutos à temperatura ambiente. Os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato aquecida (PBS) e mantidos em PBS durante todo o processo de aquisição de imagem. As imagens foram capturadas usando os mesmos limites de exposição para cada filtro. Nesta experiência, as células não tratadas mostraram forte coloração de DAPI com apenas leve e esparsa coloração de PI, indicando que bactérias dentro do biofilme estavam vivas **(FIG. 15).** Após 24 horas de tratamento com BM3103, houve um aumento dependente da dose na coloração de PI de 0,008 mM para 0,125 mM, indicando que a maioria das bactérias estava morta ou morrendo dentro do biofilme **(FIG. 15)**. Concentrações acima de 0,125 mM deram um resultado semelhante.

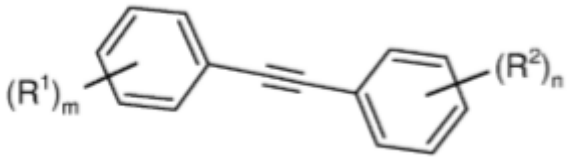
[000119] A descrição anterior dos vários aspectos e modalidades da presente invenção foi apresentada para fins de ilustração e descrição. Não é destinado a ser exaustiva ou todas as encarnações ou limitar a invenção aos aspectos específicos divulgados. Modificações óbvias ou variações são possíveis à luz dos ensinamentos acima e tais modificações e variações podem cair bem no escopo da invenção conforme determinado pelas reivindicações

acrescentadas quando interpretados de acordo com a amplitude que lhes são legalmente, leais e bastante direito.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para inibir o crescimento ou a morte de micróbios patogênicos suspeitos em uma superfície física ou biológica, caracterizado pelo fato de que compreende contatar a superfície física ou biológica com uma formulação antimicrobiana que compreende:

uma quantidade antimicrobianamente eficaz de um composto de tolano substituído por a estrutura (I):



(I)

em que R^1e R^2 são substituintes independentes em qualquer posição disponível dos anéis fenil, e m e n são independentemente 1, 2 ou 3, representando o número de substituintes nos anéis fenil, respectivamente; e

em que cada R^1, R^2, é selecionado independentemente de hidróxi, tiol, -(C_1-C_6)alcoxi, -(C_1-C_6)RH" em que R é O ou S e (halo)$_p$(C_1-C_6)alquil-, onde p é 1, 2 ou 3; e sais dos mesmos;

com a condição de que o composto de tolano substituído não seja 3,4',5-tri-hidroxitolano.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o tolano é um metóxi tolano.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que pelo menos um de R^1 e R^2 é hidróxi.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que R^1a é -(C_1-C_6)alcoxi e m é 1 ou 2.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que R^2 é hidroxil e n é 1, 2 ou 3.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que R^2 é hidroxil e n é 1, 2 ou 3.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o tolano substituído é selecionado de 4,4'-di-hidroxitolano, 4,4'-di-hidroxi-3-metoxitolano, 4-hidroxi-4'-metoxitolano, 3,5,3',5'tetra-hidroxitolano, 2,4,4'-trimetoxitolano, 3,5,3',5' tetrametoxitolano e 4-hidroxi-4'-trifluorometiltiltolano.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o composto de tolano substituído está presente em uma quantidade de cerca de 0,01% a cerca de 30% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a formulação antimicrobiana tem um pH de cerca de 4,1 a cerca de 8,5, e em que a formulação antimicrobiana inclui ainda um agente de limpeza e um agente antimicrobiano secundário.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o agente de limpeza está substancialmente livre de fenol.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o agente antimicrobiano secundário é selecionado de derivados de fenol, diclorofeno, hexaclorofeno, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos antimicrobianos e derivados dos mesmos, compostos organometálicos, compostos de iodo, compostos de amônio quaternário, compostos de sulfônio e fosfônio, compostos de mercúrio e metais alcalinos,metais alcalino terrosos e sais de metais pesados dos mesmos, ureias, tribromossalicilanilida, 2-bromo-2-nitro-1,3-di-hidroxipropano, diclorobenzoxazolona, clorohexidina, isotiazolona, derivados de benzisotiazolona e combinações de quaisquer dois ou mais destes.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a superfície é uma superfície física selecionada de equipamentos cirúrgicos, instrumentos cirúrgicos e superfícies de bancada que devem ser esterilizados e permanecer estéreis durante um procedimento cirúrgico.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a superfície é uma superfície física selecionada de superfícies de preparação de alimentos selecionadas de tábuas de corte, bancadas e utensílios de cozinha.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a superfície é uma superfície biológica em um local onde a pele não está totalmente intacta, o local selecionado entre linhas ou orifícios intravenosos, linhas ou orifícios arteriais, linhas PICC, cateteres, drenos e locais de incisão.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a interrupção de um biofilme bacteriano in situ.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a superfície é uma superfície biológica humana selecionada de pele, couro cabeludo, cabelo, olhos, membranas mucosas e orifícios internos ou externos.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que os micróbios patogênicos suspeitos são bactérias Gram-negativas.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que os micróbios patogênicos suspeitos são bactérias Gram-positivas.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que os micróbios patogênicos suspeitos são fungos.

20. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que os micróbios patogênicos suspeitos são patógenos bacterianos selecionados das espécies *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*

baumannii e *E. Coli*.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que os micróbios patogênicos suspeitos são fungos do gênero Candida.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que os fungos são *Candida albicans*.

23. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 26, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a formulação antimicrobiana compreende ainda um antibiótico, ou em que a superfície física ou biológica é ainda contatada com o antibiótico.

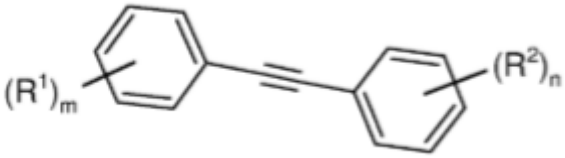
24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o antibiótico compreende um aminoglicosídeo, ansamicina, um carbacefemo, um flagil (metronidazol), um sulfato de neomicina, um carbapenemo, uma cefalosporina, um glicopeptídeo, um macrolídeo, um monobactamo, uma penicilina, um polipeptídeo, um polimixina, uma quinolona, uma sulfonamida ou uma tetraciclina.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o antibiótico é selecionado do grupo que consiste em: clindamicina, tigeciclina, vancomicina, ciprofloxacina, ofioxacina, sulfametoxazol, trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina, penicilina V, penicilina G, procaína, penicilina, penicilina benzatina, carbencilina, mezlocilina, ampicilina, piperacilina, arsfenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina (rifampina nos EUA), tianfenicol, timidazol, dapsona, lofazimina, bacampicilina, tiearcilina, ticarcilina, piperacilina/tazobactam, aztreonam, cefotetano, loracarbef, mefoxina, merrem, levofloxacina, lomefioxacina, primaxim, cicloserina, canamicina, dicloxacilina, demeclociclina, minociclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tobramicina, gentamicina, neomicina, amikacina,

craramieina, nebcina, eritromicina/sulfisoxazol, netromicina, estreptomicina, tobramicina, cefotaxima, cefuroxima, cefazolina, ceftibuteno, ceftizoxima, cefaclor, cefopoerazona, cefprozil, cefadroxil monohidrato, ceftazidima, trimetoprim/sulfametoxazol, cefalexina, cefazolina, nafatato de cefamandol, cefepima, cefonicida, sulfadiazina, norfloxacina, enoxacina, cefdinir, seromicina, ceftriaxona, cefixima, ceftazidima, claritromicina, diritromicina, metenamina, etionamida, trovafioxacina, sparfloxacina, interfon-a, indinavir, ganciclovir, foscamet, lamivudina, famciclovir, rimantadina, zalcitabina, interferon-β, indinavir, ganciclovir, saquinavir, ritonavir, ribavirina, eritromicina, troleandomicina, azitromicina, elidamicina, colistina, anfotericina B, flucitosina, fluconazol, grisedeulvina, grepafloxacina, grisedeulvina de tamanho ultramicro, terbinafina, cetoconazol, clotrimazol, dapsona, delavirdina, ziduvudina, amantadina, palivizumab, valaciclovir, didanosina, nelfinavir, nevirapina, ribavirina, ciddeovir, pirimetamina, metronidazol, furazolidona, atovaquona, estavudina, lamiduvina, aciclovir, mionazol, nistatina, itraconazol, cloroquina, pirimetamina, mefloquina, hidroxicloroquina, capreomicina, permetrina, crotamiton, lindano, fluoro-uracila, etambutol, rifabutina, isoniazidaa, ácido aminosalicíclico, rifapentina, pirazinamida, peróxido de coenzoil, gluconato de clorhexidina, oxicloroseno de sódio, peroxido de benzoil, rifampicinaa, rifampicina/isoniazidaa, rifampicina/isoniazida/pirazinamida, nitrofurantoína, linezolida, nitrofurantoína, fosfomicina, ácido nalidixíco, atropina, oxitetraciclina/sulfametizol/fenazopiridina, cloranfenicol, neomicina/polimixina, tfimetorpim/politixina, tobramicina/dexametasona, vidatabina, ciprdeloxacina, deloxacina, sulfacetamida, povidoneodina, gentamicina, cloranfenicol, bacitracina, sulconazol, terbinafina, tetraclorosalicilanilida, metronidazol, metromdazol, ciclopiroxolamina, clotrimazol, clotrimazol/betametasona, butenafina, clotrimazol, naftifina, oxiconazol, selênio, econazol, penciclovir ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

26. Método para inibir ou interromper a formação de biofilme de um micróbio

ou micróbios, o método, caracterizado pelo fato de que compreende contatar micróbio ou micróbios com uma formulação antimicrobiana que compreende:
uma quantidade eficaz de um composto de tolano substituído por a estrutura (I):



(I)

em que R^1 e R^2 são substituintes independentes em qualquer posição disponível dos anéis fenil, e m e n são independentemente 1, 2 ou 3, representando o número de substituintes nos anéis fenil, respectivamente; e
em que cada R^1, R^2, é selecionado independentemente de hidróxi, tiol, -(C_1-C_6)alcoxi, -(C_1-C_6)RH" em que R é O ou S e $(halo)_p$(C_1-C_6)alquil-, onde p é 1, 2 ou 3; e sais dos mesmos;
com a condição de que o composto de tolano substituído não seja 3,4',5-tri-hidroxitolano.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o composto de tolano está presente na formulação antimicrobiana a uma concentração que varia de cerca de 0,008 mM a cerca de 1 mM.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o composto de tolano está presente na formulação antimicrobiana a uma concentração de cerca de 0,625 mM.

29. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o composto de tolano está presente na formulação antimicrobiana em uma quantidade que varia de cerca de 0,0001% a cerca de 30% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana.

30. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o composto de tolano está presente na formulação antimicrobiana em uma quantidade que varia de cerca de 0,01% a

cerca de 25% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana.

31. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o composto de tolano está presente na formulação antimicrobiana em uma quantidade que varia de cerca de 0,1% a cerca de 30% em peso, com base no peso total da formulação antimicrobiana.

32. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a formulação antimicrobiana é administrada de uma vez ao dia até cerca de 6 vezes por dia.

33. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a formulação antimicrobiana é administrada por uma via de administração selecionada do grupo que consiste em tópico, transdérmico, oral, nasal, oftálmico, ótico, intravenoso, intramuscular, subcutâneo, retal e vaginal.

34. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o composto de tolano compreende 4-hidroxi-4'-metoxitolano.

35. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o micróbio ou micróbios compreendem bactérias Gram-positivas.

36. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o micróbio ou micróbios compreendem bactérias Gram-negativas.

37. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o micróbio ou micróbios compreendem um fungo.

38. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação 42 ou 44, caracterizado pelo fato de que o micróbio ou micróbios compreendem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

39. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 1, ou o uso da reivindicação

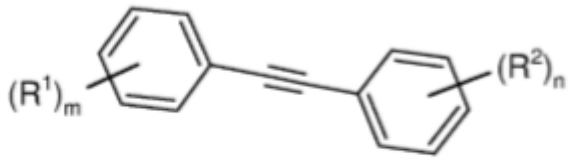
42 ou 44, caracterizado pelo fato de que a formulação antimicrobiana compreende ainda um antibiótico, ou em que o micróbio ou micróbios são ainda contatados com o antibiótico.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o antibiótico compreende um aminoglicosídeo, ansamicina, um carbacefemo, um flagil (metronidazol), um sulfato de neomicina, um carbapenemo, uma cefalosporina, um glicopeptídeo, um macrolídeo, um monobactamo, uma penicilina, um polipeptídeo, um polimixina, uma quinolona, uma sulfonamida ou uma tetraciclina.

41. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o antibiótico é selecionado do grupo que consiste em: clindamicina, tigeciclina, vancomicina, ciprofloxacina, ofioxacina, sulfametoxazol, trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina, penicilina V, penicilina G, procaína penicilina, penicilina benzatina, carbencilina, mezlocilina, ampicilina, piperacilina, arsfenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, linezolida, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, (rifampina nos EUA), tianfenicol, timidazol, dapsona, lofazimina, bacampicilina, tiearcilina, ticarcilina, piperacilina/tazobactam, aztreonam, cefotetano, loracarbef, mefoxina, merrem, levofloxacina, lomefioxacina, primaxim, cicloserina, canamicina, dicloxacilina, demeclociclina, minociclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tobramicina, gentamicina, neomicina, amikacina, craramieina, nebcina, eritromicina/sulfisoxazol, netromicina, estreptomicina, tobramicina, cefotaxima, cefuroxima, cefazolina, ceftibuteno, ceftizoxima, cefaclor, cefopoerazona, cefprozil, cefadroxil monohidrato, ceftazidima, trimetoprim/sulfametoxazol, cefalexina, cefazolina, nafatato de cefamandol, cefepima, cefonicida, sulfadiazina, norfloxacina, enoxacina, cefdinir, seromicina, ceftriaxona, cefixima, ceftazidima, claritromicina, diritromicina, metenamina, etionamida, trovafioxacina, sparfloxacina, interfon-α, foscamet, lamivudina,

famciclovir, rimantadina, zalcitabina, interferon-β, indinavir, ganciclovir, saquinavir, ritonavir, ribavirina, eritromicina, troleandomicina, azitromicina, elidamicina, colistina, anfotericina B, flucitosina, fluconazol, grisedeulvina, grepafloxacina, grisedeulvina de tamanho ultra micro, terbinafina, cetoconazol, clotrimazol, dapsona, delavirdina, ziduvudina, amantadina, palivizumab, valaciclovir, didanosina, nelfinavir, nevirapina, ribavirina, ciddeovir, pirimetamina, metronidazol, furazolidona, atovaquona, estavudina, lamiduvina, aciclovir, mionazol, itraconazol, cloroquina, pirimetamina, mefloquina, hidroxicloroquina, capreomicina, permetrina, crotamiton, lindano, fluoro-uracila, etambutol, rifabutina, isoniazidaa, ácido aminosalicíclico, rifapentina, pirazinamida, peróxido de coenzoil, gluconato de clorhexidina, oxicloroseno de sódio, peroxido de benzoil, rifampicina, rifampicina/isoniazida, rifampicina/isoniazida/pirazinamida, nitrofurantoína, linezolida, nitrofurantoína, fosfomicina, ácido nalidixíco, atropina, oxitetraciclina/sulfametizol/fenazopiridina, cloranfenicol, neomicina/polimixina, tfimetorpim/politixina, tobramicina/dexametasona, vidatabina, ciprdeloxacina, deloxacina, sulfacetamida, povidoneodina, gentamicina, nistatina, cloranfenicol, bacitracina, sulconazol, terbinafina, tetraclorosalicilanilida, metronidazol, metronidazol, ciclopiroxolamina, clotrimazol, clotrimazol/betametasona, butenafina, clotrimazol, naftifina, oxiconazol, selênio, econazol, penciclovir, e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

42. Uso de um composto de tolano substituído por a estrutura (I), caracterizado pelo fato de que na fabricação de uma formulação antimicrobiana:



(I)

em que R^1 e R^2 são substituintes independentes em qualquer posição disponível

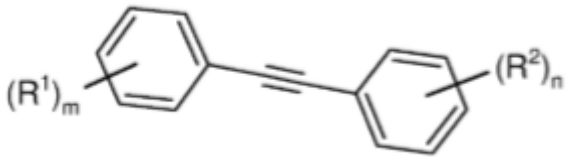
dos anéis fenil, e m e n são independentemente 1, 2 ou 3, representando o número de substituintes nos anéis fenil, respectivamente; e

em que cada R^1, R^2, é selecionado independentemente de hidróxi, tiol, -(C_1-C_6)alcoxi, -(C_1-C_6)RH" em que R é O ou S e (halo)$_p$(C_1-C_6)alquil-, onde p é 1, 2 ou 3; e sais dos mesmos;

com a condição de que o composto de tolano substituído não seja 3,4',5-tri-hidroxitolano

43. Uso, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o tolano substituído é selecionado de 4,4'-di-hidroxitolano, 4,4'-di-hidroxi-3-metoxitolano, 4-hidroxi-4'-metoxitolano, 3,5,3',5' tetra-hidroxitolano, 2,4,4'-trimetoxitolano, 3,5,3',5' tetrametoxitolano e 4-hidroxi-4'-trifluorometiltiltolano.

44. Uso de um composto de tolano substituído por a estrutura (I), caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um agente disruptivo de biofilme:



(I)

em que R^1 e R^2 são substituintes independentes em qualquer posição disponível dos anéis fenil, e m e n são independentemente 1, 2 ou 3, representando o número de substituintes nos anéis fenil, respectivamente; e

em que cada R^1, R^2, é selecionado independentemente de hidróxi, tiol, -(C_1-C_6)alcoxi, -(C_1-C_6)RH" em que R é O ou S e (halo)$_p$(C_1-C_6)alquil-, onde p é 1, 2 ou 3; e sais dos mesmos;

com a condição de que o composto de tolano substituído não seja 3,4',5-tri-hidroxitolano.

45. Uso, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o tolano substituído é selecionado de 4,4'-di-hidroxitolano, 4,4'-di-hidroxi-3-

metoxitolano, 4-hidroxi-4'-metoxitolano, 3,5,3',5' tetra-hidroxitolano, 2,4,4'-trimetoxitolano, 3,5,3',5' tetrametoxitolano e 4-hidroxi-4'-trifluorometiltiltolano.

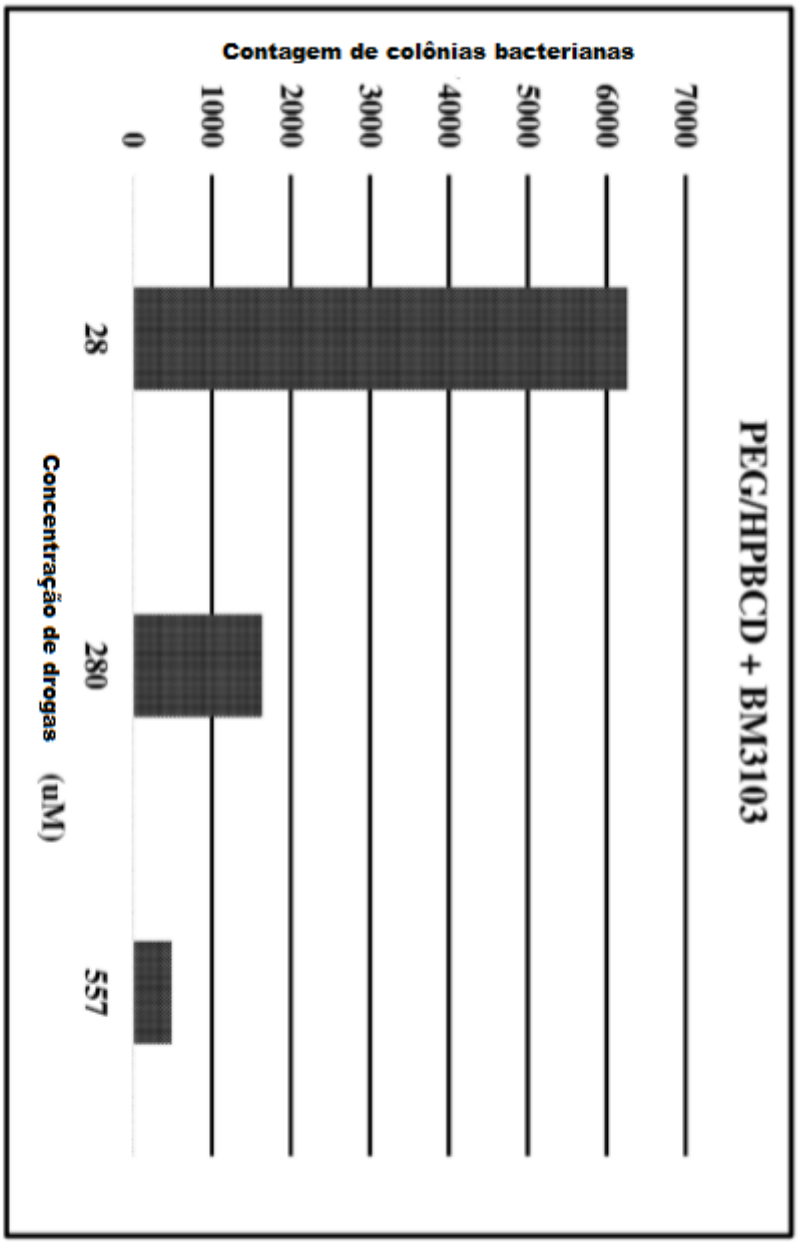

PEG/HPBCD + BM3103
Contagem de colônias bacterianas
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
28
280
557
Concentração de drogas (uM)

FIG. 1

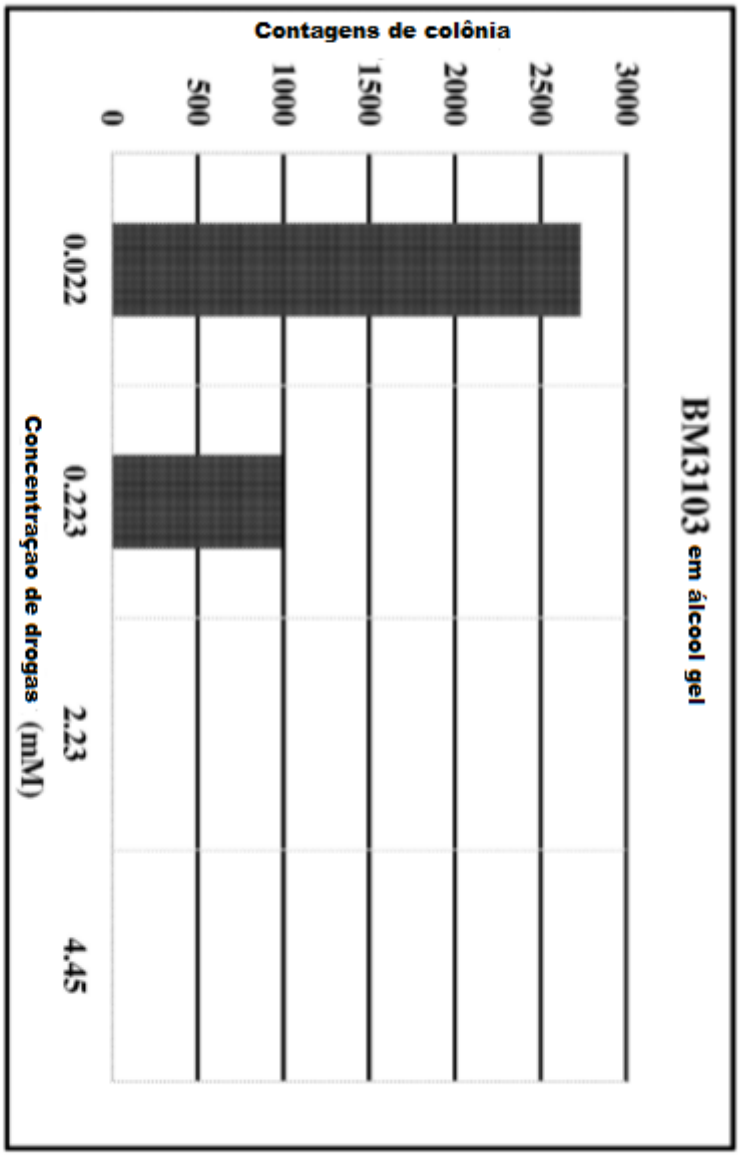

BM3103 em álcool gel
Contagens de colônia
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0.022
0.223
2.23
4.45
Concentração de drogas (mM)

FIG. 2

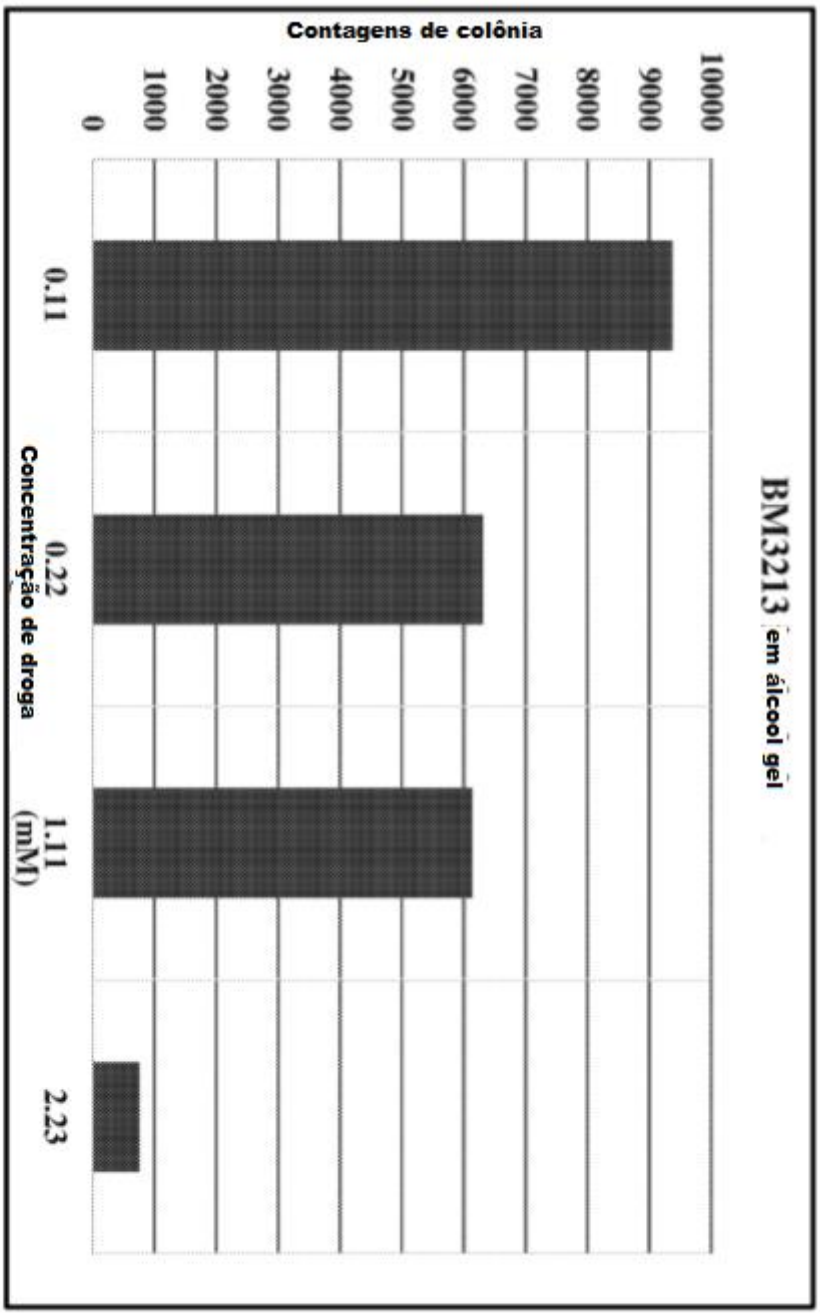

BM3213 em álcool gel
Contagens de colônia
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.11
0.22
1.11
2.23
Concentração de droga (mM)

FIG. 3

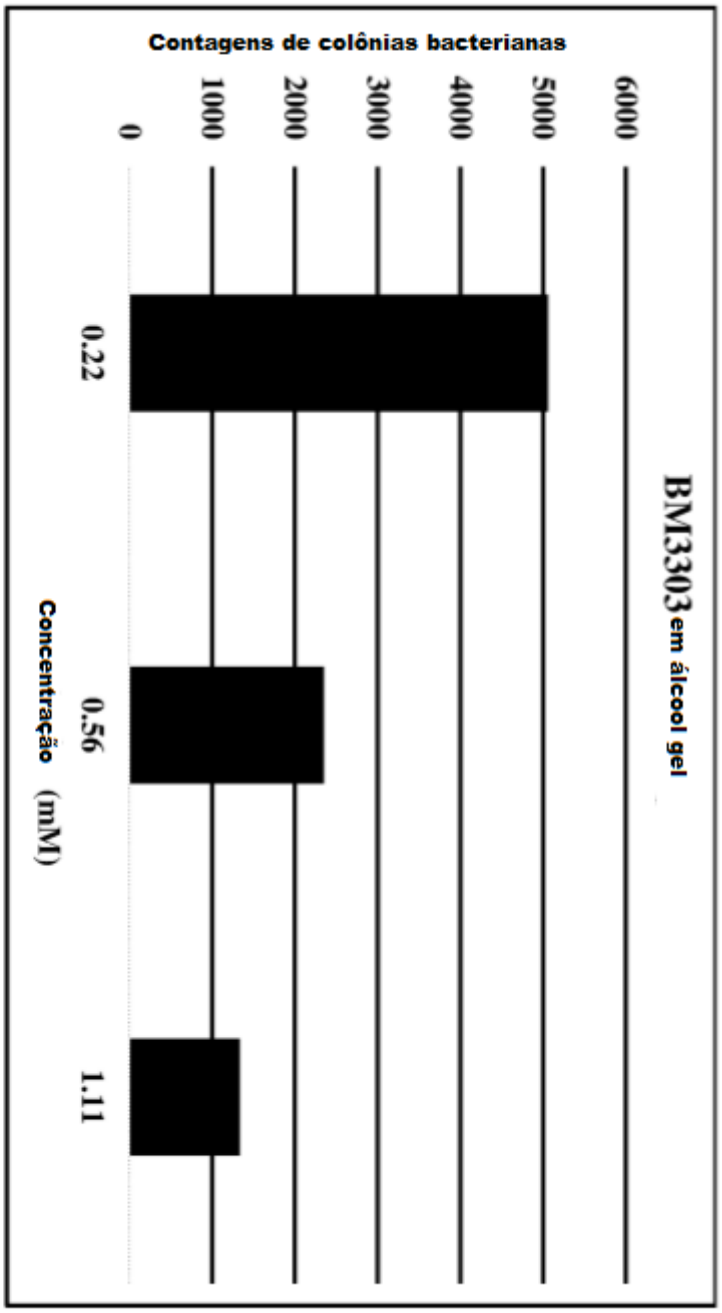

Contagens de colônias bacterianas
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
BM3303 em álcool gel
0.22
0.56
1.11
Concentração (mM)

FIG. 4

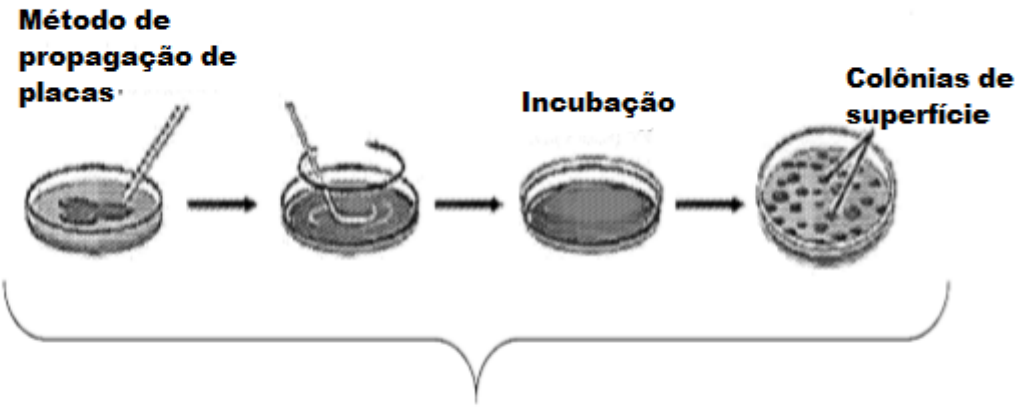

Método de propagação de placas
Incubação
Colônias de superfície

FIG. 5

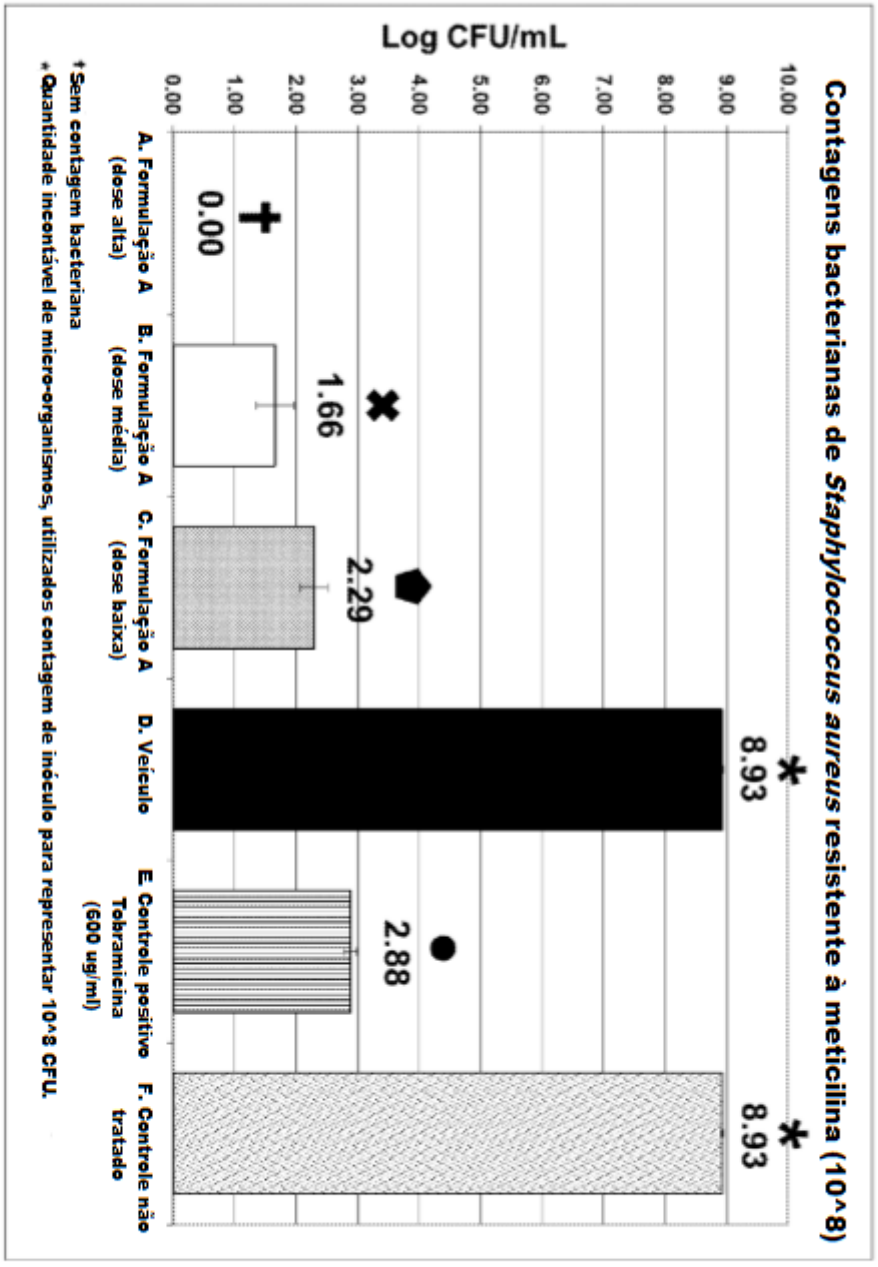
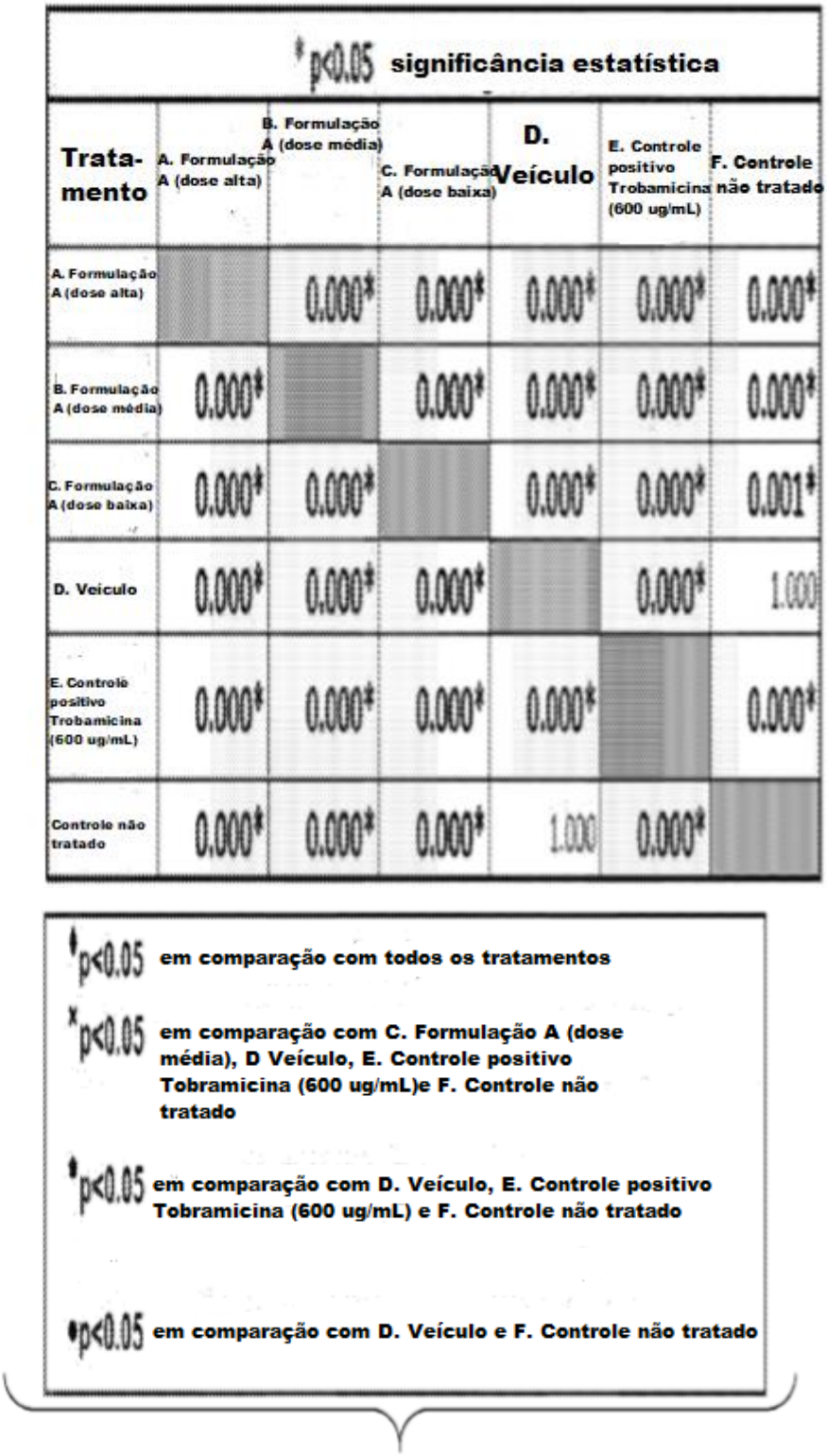

Contagens bacterianas de Staphylococcus aureus resistente à meticilina (10^8)
Log CFU/mL
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
8.93
8.93
2.29
1.66
2.88
0.00
A. Formulação A (dose alta)
B. Formulação A (dose média)
C. Formulação A (dose baixa)
D. Veículo
E. Controle positivo Tobramicina (600 ug/ml)
F. Controle não tratado
†Sem contagem bacteriana
*Quantidade incontável de micro-organismos, utilizados contagem de inóculo para representar 10^8 CFU.

FIG. 6A



$^{\ddagger}p<0.05$ significância estatística

Tratamento	A. Formulação A (dose alta)	B. Formulação A (dose média)	C. Formulação A (dose baixa)	D. Veículo	E. Controle positivo Trobamicina (600 ug/mL)	F. Controle não tratado
A. Formulação A (dose alta)		0.000‡	0.000‡	0.000‡	0.000‡	0.000‡
B. Formulação A (dose média)	0.000‡		0.000‡	0.000‡	0.000‡	0.000‡
C. Formulação A (dose baixa)	0.000‡	0.000‡		0.000‡	0.000‡	0.001‡
D. Veículo	0.000‡	0.000‡	0.000‡		0.000‡	1.000
E. Controle positivo Trobamicina (600 ug/mL)	0.000‡	0.000‡	0.000‡	0.000‡		0.000‡
Controle não tratado	0.000‡	0.000‡	0.000‡	1.000	0.000‡	

$^{\ddagger}p<0.05$ em comparação com todos os tratamentos

$^{x}p<0.05$ em comparação com C. Formulação A (dose média), D Veículo, E. Controle positivo Tobramicina (600 ug/mL)e F. Controle não tratado

$^{\ddagger}p<0.05$ em comparação com D. Veículo, E. Controle positivo Tobramicina (600 ug/mL) e F. Controle não tratado

$^{\bullet}p<0.05$ em comparação com D. Veículo e F. Controle não tratado

FIG. 6B

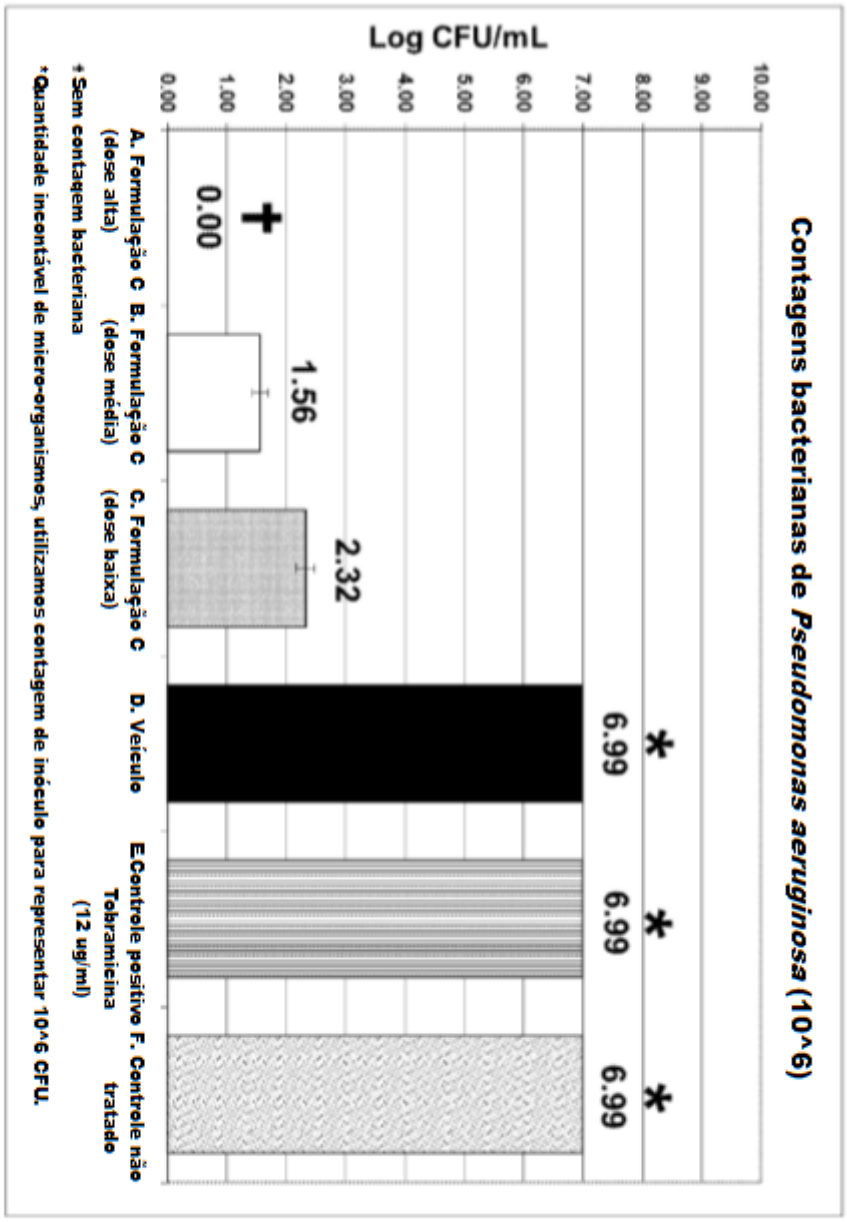

Contagens bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* (10^6)
Log CFU/mL
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
0.00
1.56
2.32
6.99
6.99
6.99
*
*
*
+
A. Formulação C (dose alta)
B. Formulação C (dose média)
C. Formulação C (dose baixa)
D. Veículo
E Controle positivo Tobramicina (12 ug/ml)
F. Controle não tratado
+ Sem contagem bacteriana
*Quantidade incontável de micro-organismos, utilizamos contagem de inóculo para representar 10^6 CFU.

FIG. 7

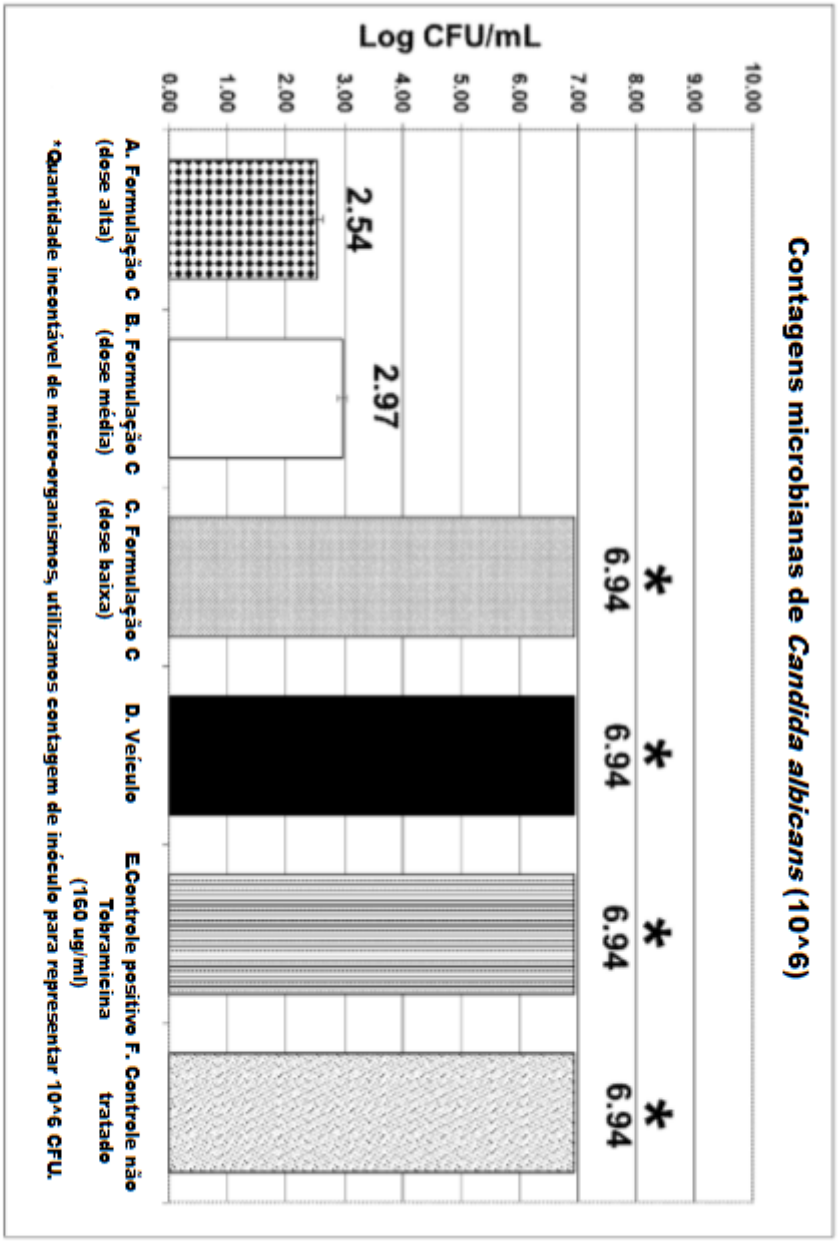

Contagens microbianas de *Candida albicans* (10^6)
Log CFU/mL
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
2.54
2.97
6.94
6.94
6.94
6.94
*
*
*
*
A. Formulação C (dose alta)
B. Formulação C (dose média)
C. Formulação C (dose baixa)
D. Veículo
E Controle positivo Tobramicina (160 ug/ml)
F. Controle não tratado
*Quantidade incontável de micro-organismos, utilizamos contagem de inóculo para representar 10^6 CFU.

FIG. 8

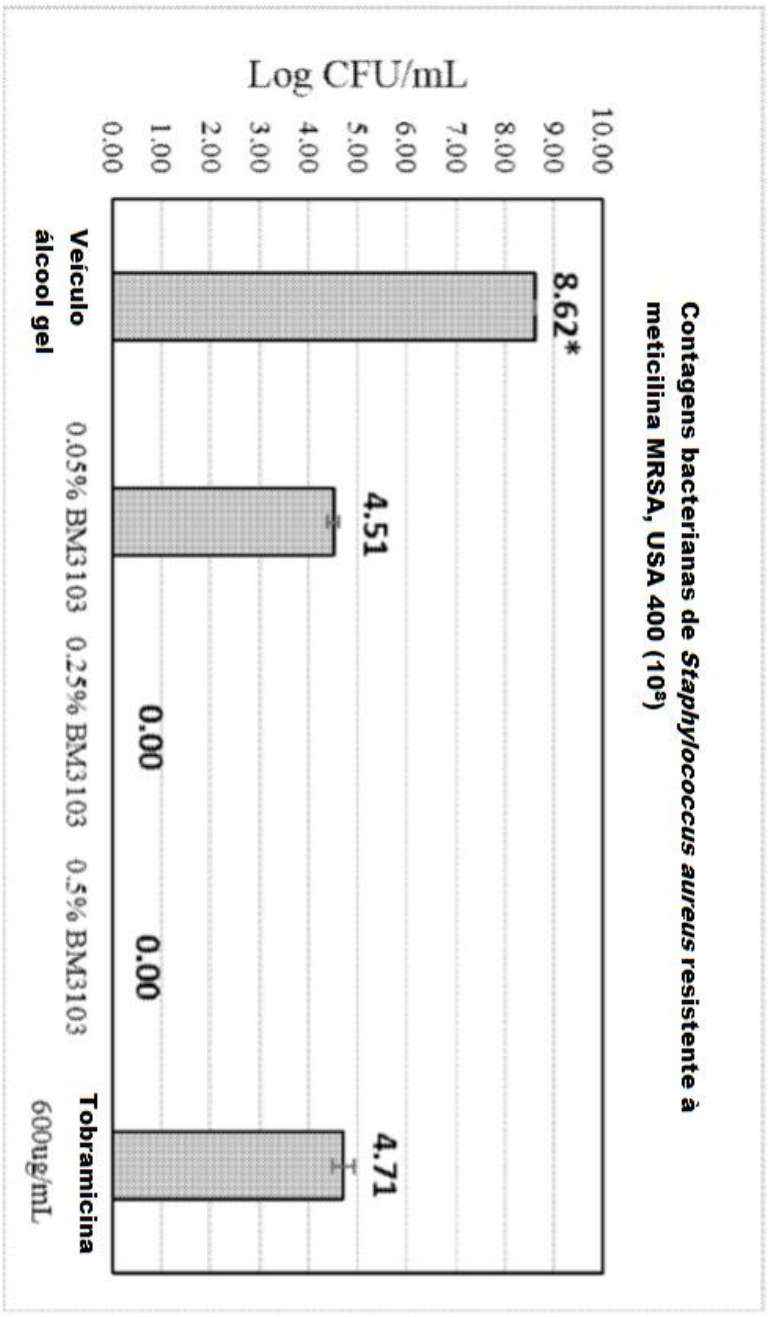

Contagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina MRSA, USA 400 (10^5)
Log CFU/mL
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
8.62*
4.51
0.00
0.00
4.71
Veículo álcool gel
0.05% BM3103
0.25% BM3103
0.5% BM3103
Tobramicina 600ug/mL

FIG. 9

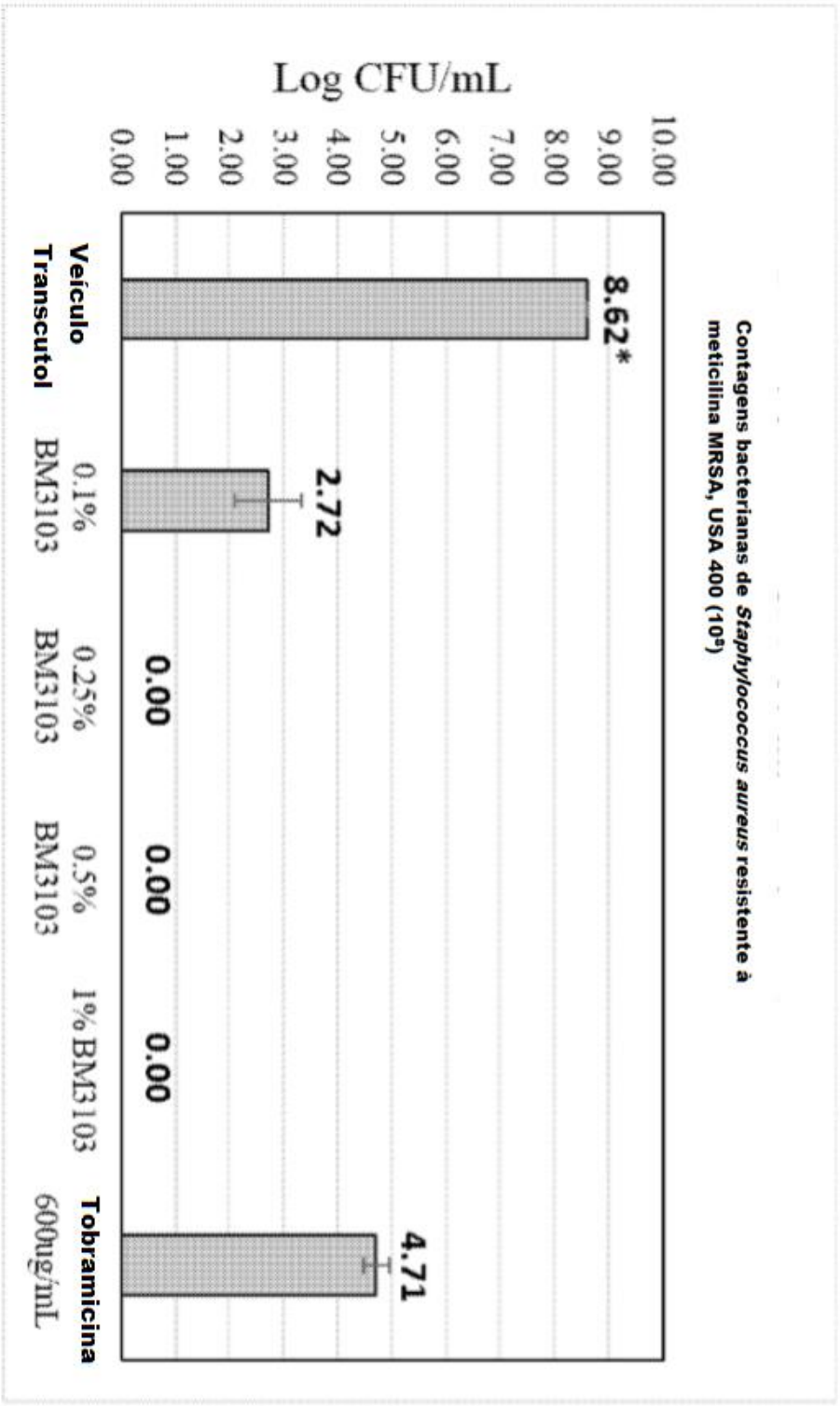

Contagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina MRSA, USA 400 (10⁸)
Log CFU/mL
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
8.62*
2.72
0.00
0.00
0.00
4.71
Veículo
Transcutol
0.1% BM3103
0.25% BM3103
0.5% BM3103
1% BM3103
Tobramicina
600ug/mL

FIG. 10

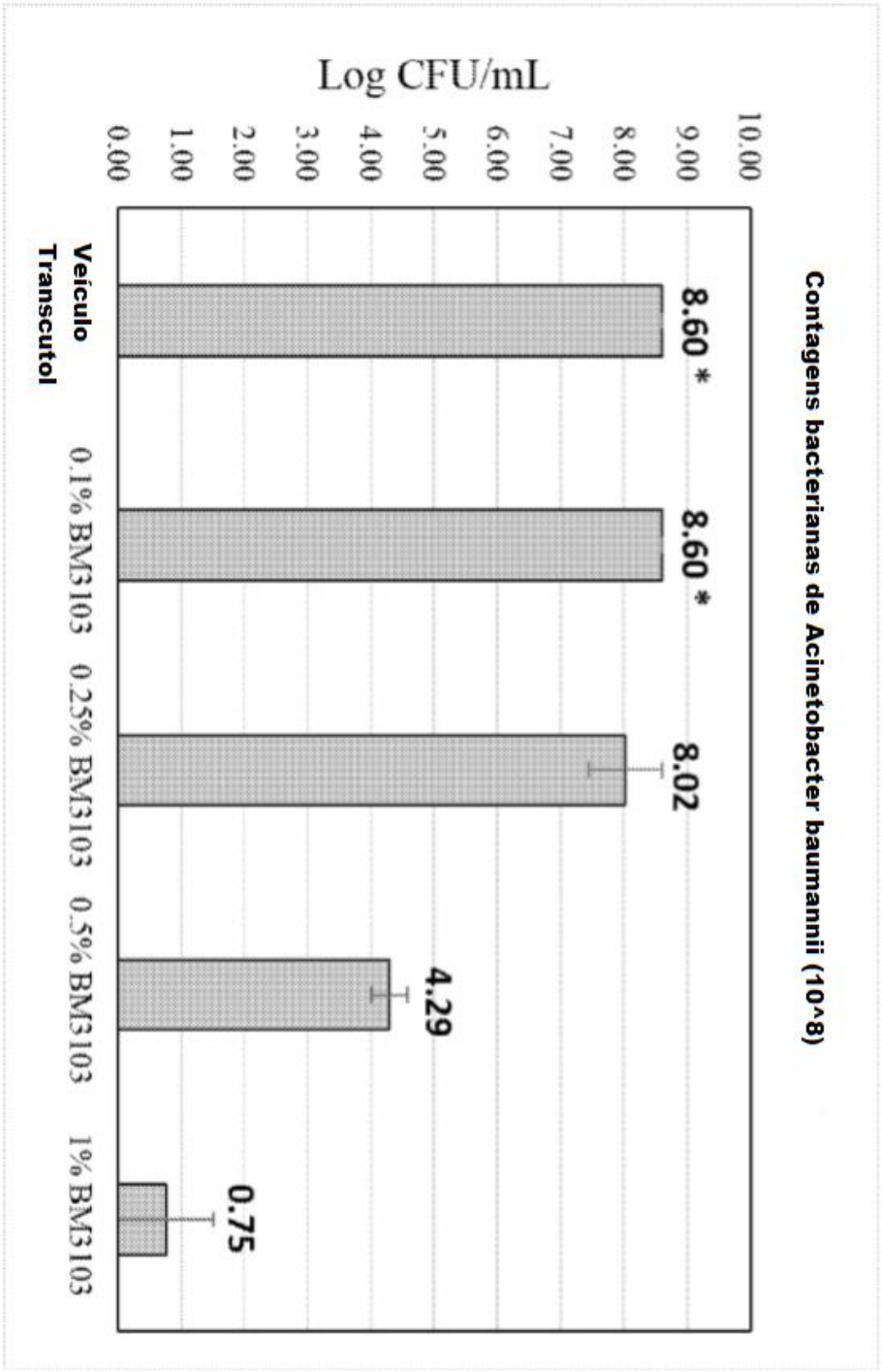
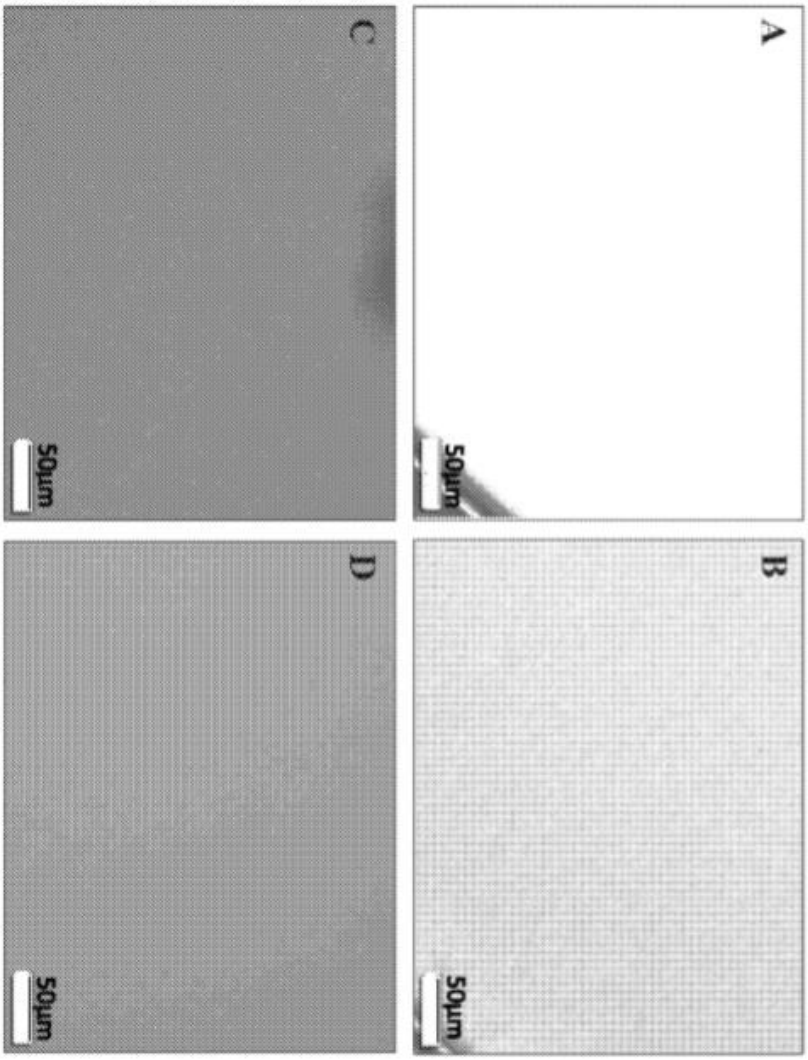

Contagens bacterianas de Acinetobacter baumannii (10^8)
Log CFU/mL
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
8.60 *
8.60 *
8.02
4.29
0.75
Veículo
Transcutol
0.1% BM3103
0.25% BM3103
0.5% BM3103
1% BM3103

FIG. 11



FIGS. 12A-12D

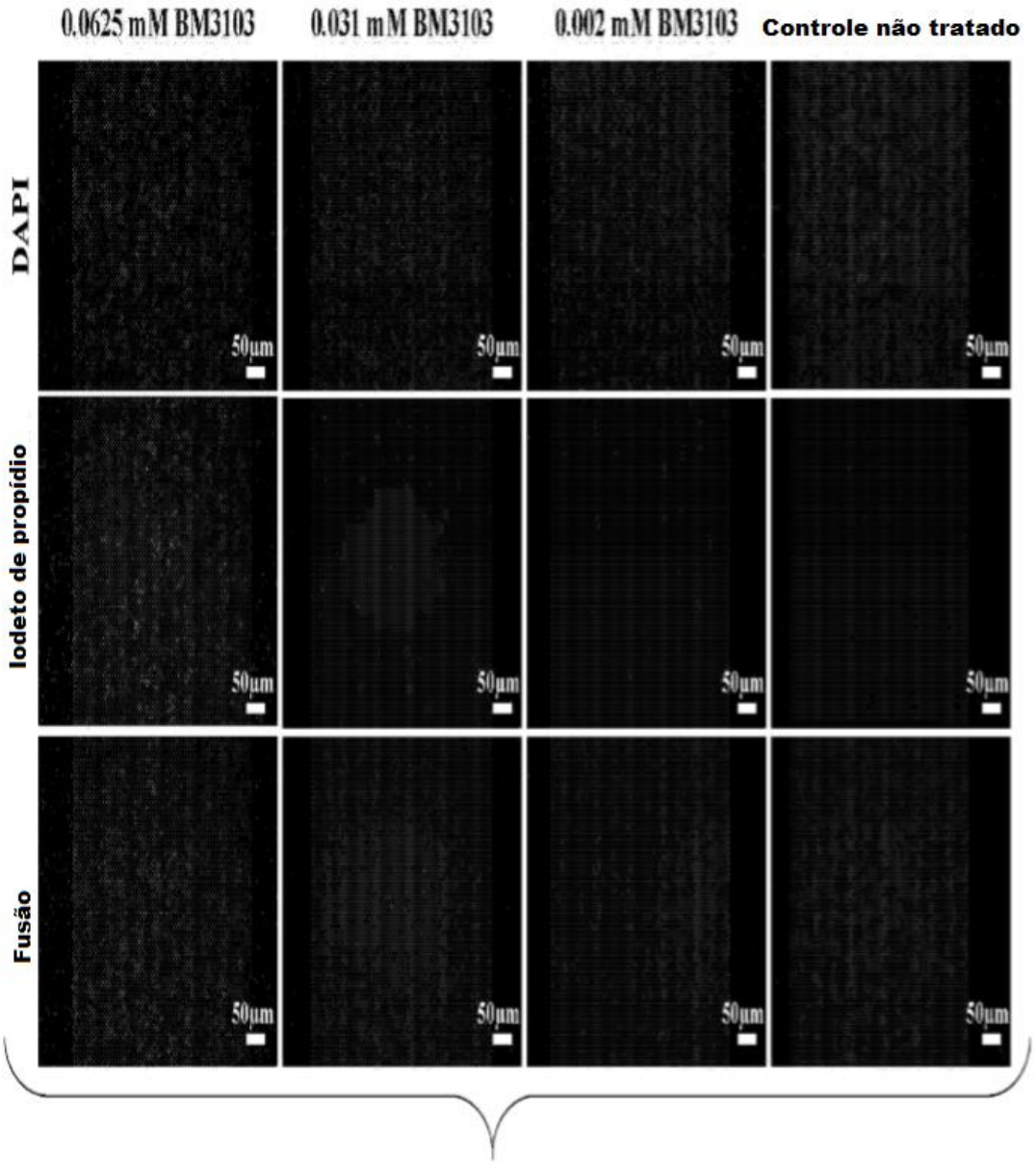
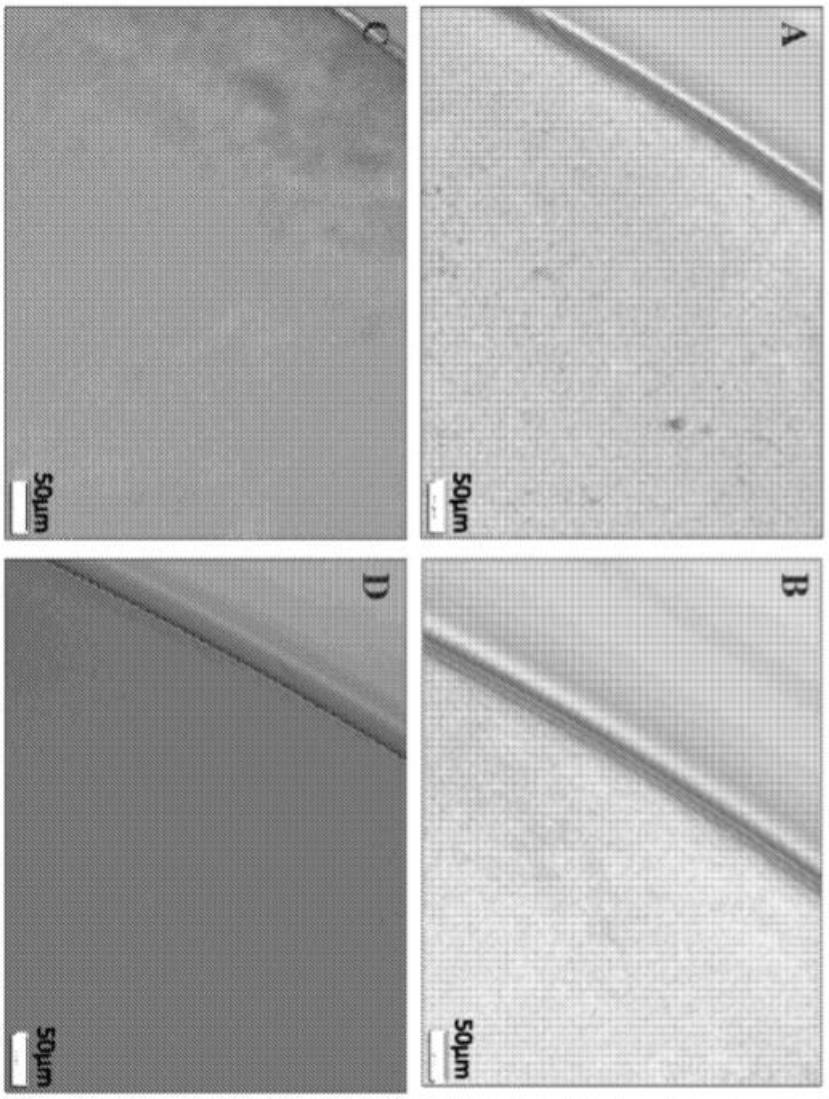

0.0625 mM BM3103
0.031 mM BM3103
0.002 mM BM3103
Controle não tratado
DAPI
Iodeto de propídio
Fusão
50µm

FIG. 13



FIGS. 14A-14D

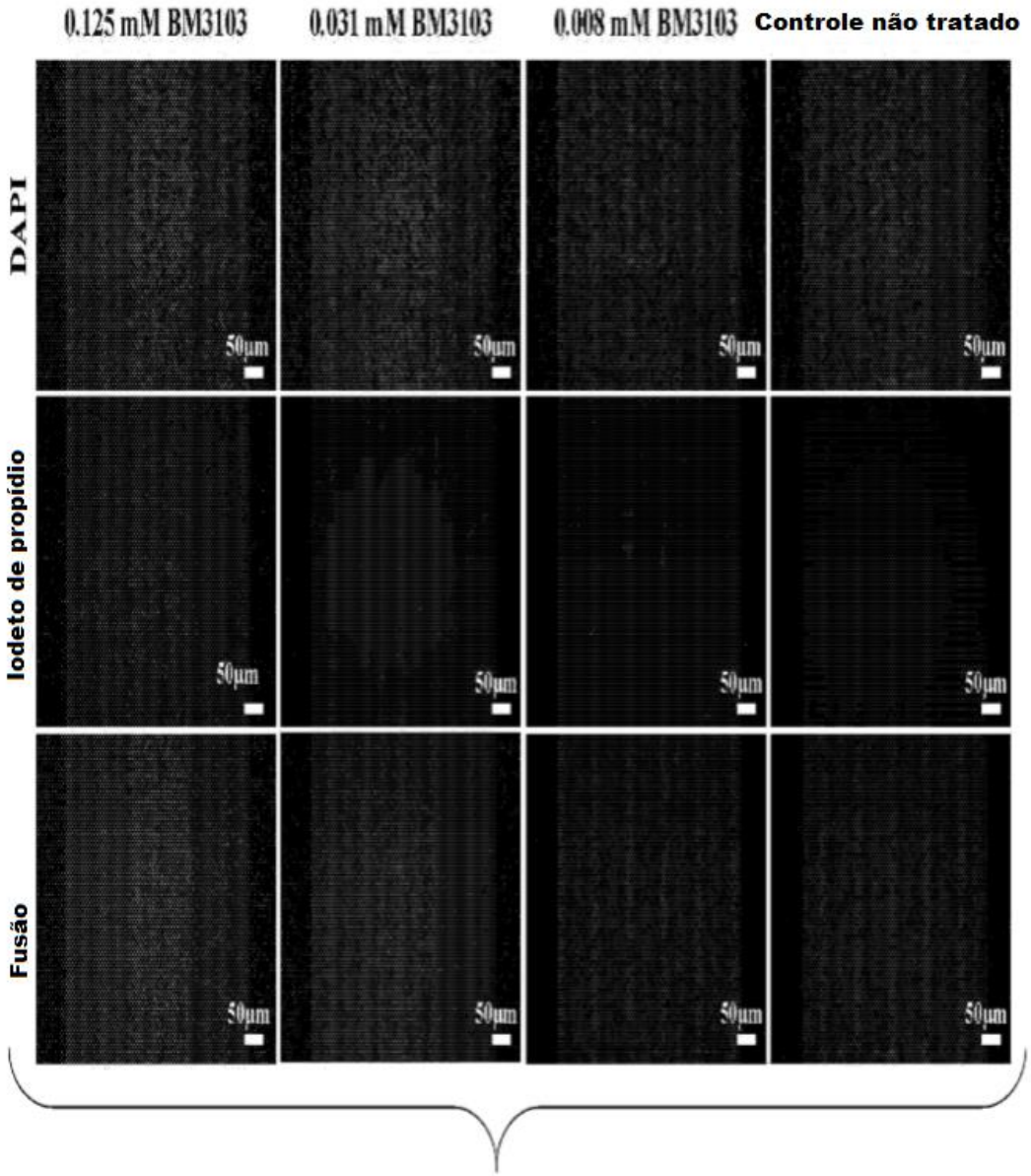

0.125 mM BM3103
0.031 mM BM3103
0.008 mM BM3103
Controle não tratado
DAPI
Iodeto de propídio
Fusão
50µm

FIG. 15

RESUMO

TOLANOS SUBSTITUÍDOS PARA A MODULAÇÃO DA COLONIZAÇÃO MICROBIANA

São descritos métodos para desinfetar uma superfície física ou biológica por contato com uma formulação antimicrobiana que compreende um composto de tolano substituído, sendo as substituições, por exemplo, um ou mais substituintes alcóxi (por exemplo, metóxi) e hidróxi em um ou ambos os anéis fenil do tolano Os compostos e métodos são -státicos e/ou -cidas, dependendo da dose e do micróbio suspeito. Micróbios patogênicos suspeitos incluem bactérias Gram-negativas, como P. aeruginosa e E. coli, bactérias Gram-positivas, como N. aureus, incluindo MRSA, e patógenos fúngicos, como Candida e C. albicans. Também são descritos métodos para inibir ou interromper a formação de biofilme de um micróbio ou micróbios.