



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

(21) PI 0720982-7 A2



(22) Data de Depósito: 27/12/2007
(43) Data da Publicação: 11/03/2014
(RPI 2253)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/235
A61K 9/08
A61K 47/02
A61K 47/18
A61K 47/26
A61K 47/34
A61P 31/04
A61P 31/10
A61P 31/12

(54) Título: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE GALATOS DE ALQUILA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 28/12/2006 JP 2006-356662, 12/10/2007 JP 2007-267254, 14/12/2007 JP 2007-323964, 28/12/2006 JP 2006-356662

(73) Titular(es): Microbiotech Inc.

(72) Inventor(es): Hirofumi Shibata, Masanori Higuchi, Tomihiko Higuchi

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007075197 de 27/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/081901 de 10/07/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE GALATOS DE ALQUILA**".

Campo Técnico

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica tendo um efeito antifúngico, antibacteriano, ou antiviral, que é útil como um produto farmacêutico, um agroquímico, um cosmético e um produto funcional alimentar. Mais particularmente, a invenção refere-se a um método para reforçar as atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais por galatos de alquila, e refere-se a uma nova composição farmacêutica útil como um agente terapêutico para infecção ou um fármaco descrito para prevenção nos campos de esterilização e desinfecção externas gerais, dermatologia, odontologia oral (cáries dentárias, periodontite, halitose, estomatite), oftalmologia, e ginecologia (saúde da mulher e proteção sanitária) ou como um produto farmacêutico, um agroquímico (animais domésticos, animais de estimação, vida marinha, plantas), um cosmético, um produto funcional alimentar e similares.

Técnica antecedente

Alguns dos galatos de alquila foram aprovados como aditivos alimentares pelo WHO e FDA (galatos de propila, galatos de octila, galatos de dodecila) ou como aditivos farmacêuticos (galatos de propila) ou como quase fármacos (galato de octila) pelo Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare; isto significa que eles são superiores em segurança.

Os presentes inventores investigaram estes galatos de alquila de um novo ponto de vista em detalhes e descobriram que estes têm atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais e propuseram usá-los como produtos farmacêuticos (Documento de patente 1).

As atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais destes galatos de alquila, entretanto, não são sempre suficientemente fortes, e o reforço de suas atividades foi desejado. Além disso, visto que os galatos de alquila foram altamente hidrofóbicos e moderadamente solúveis em água, sua formulação não foi sempre fácil.

Descrição da Invenção

Problema a ser solucionado pela invenção

Na situação acima mencionada, o propósito da invenção é reforçar as atividades antifúngicas, antivirais e antibacterianas dos galatos de alquila também desenvolvendo e aprofundando o estudo dos inventores, e fornecer uma nova tecnologia e métodos que permitam a solubilização dos galatos de alquila em água.

Meios para Solucionar os Problemas

A fim de solucionar o problema mencionado acima, a invenção é caracterizada pelos seguintes:

Primeiro: A composição farmacêutica de galatos de alquila que contém galatos de alquila como ingredientes ativos tendo um efeito antifúngico, antiviral ou antibacteriano, em que o grupo alquila do galato de alquila é ligado a um grupo galoila para formar uma ligação de éster, caracterizada por compreender os seguintes dois membros de galatos de alquila:

(A) um galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é na faixa de 5 a 16; e

(B) outro galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é menor do que aquele de (A).

Segundo: A primeira composição farmacêutica de galatos de alquila, caracterizada pelo fato de que o número de carbono do grupo alquila do galato de alquila (B) é na faixa de 2 a 7.

Terceiro: A primeira ou segunda composição farmacêutica de galatos de alquila, caracterizada por também conter (C) pelo menos um membro selecionado de um sal de metal de álcali, ácido bórico, borato de sódio e um sal orgânico.

Quarto: Qualquer uma da primeira à terceira composição farmacêutica de galatos de alquila, caracterizada pelo fato de que é uma solução aquosa em que os galatos de alquila são solubilizados misturando-se os galatos de alquila com pelo menos um membro selecionado de um tensoativo não-iônico, polietileno glicol e arginina ou um cloridrato de um derivado destas em uma solução aquosa ou em um tampão de pH.

Quinto: A quarta composição farmacêutica de galatos de alquila, caracterizada pelo fato de que é uma solução aquosa em que os galatos de alquila são solubilizados misturando-se 1 a 10 partes em peso de um tensoativo não-iônico e 100 a 5000 partes em peso de água com base em 1 parte em peso de galatos de alquila.

Sexto: A quinta composição farmacêutica de galatos de alquila, caracterizada pelo fato de que é uma solução aquosa em que os galatos de alquila são solubilizados misturando-se e aquecendo-se os galatos de alquila em uma temperatura de 30 a 95°C seguido por resfriamento em temperatura ambiente.

Efeito da Invenção

De acordo com a invenção, as atividades antifúngicas, antivirais e antibacterianas no produto farmacêutico contendo galatos de alquila podem ser aumentadas, e os galatos de alquila podem ser solubilizados em água.

Breve Descrição dos Desenhos

[Figura 1] A Figura 1 é um gráfico mostrando uma redução do tempo requerido para matar bactérias pelo uso concomitante de galatos de octila e galatos de propila contra cepas de MRSA COL.

[Figura 2] A Figura 2 é um gráfico mostrando uma redução do tempo requerido para matar mofo pelo uso concomitante de galatos de octila e galatos de propila contra *Candida albicans* ATCC 10231.

[Figura 3] A Figura 3 é um gráfico mostrando reforço da atividade virótica da influenza de galatos de n-dodecila por galato de n-hexila e galato de n-butila. O eixo abscissa indica as concentrações de galatos de n-dodecila.

[Figura 4] A Figura 4 é um gráfico mostrando reforço da atividade viral anti-influenza de galatos de octila em células MDCK por galatos de propila.

[Figura 5] A Figura 5 é um gráfico mostrando o efeito de reforço de galatos de propila sobre a atividade antiviral de galatos de octila contra HSV-1.

[Figura 6] A Figura 6 é um gráfico mostrando uma redução do

tempo requerido para matar viroses pelo uso concomitante de galatos de octila e galatos de propila contra influenza B/T/1/05.

[Figura 7] A Figura 7 é um gráfico mostrando o curso de tempo da atividade virótica de galatos de octila sozinho contra o vírus influenza B/T/1/05.

[Figura 8] A Figura 8 é um gráfico mostrando o curso de tempo da atividade virótica de galatos de propila sozinho contra o vírus influenza B/T/1/05.

[Figura 9] A Figura 9 é um gráfico mostrando o efeito da concentração de galatos de propila sobre o curso de tempo da atividade virótica de galatos de octila (5 mg/L) contra vírus influenza B/T/1/05.

[Figura 10] A Figura 10 é um gráfico mostrando o efeito da concentração de galatos de propila sobre o curso de tempo da atividade virótica de galatos de octila (10 mg/L) contra o vírus influenza B/T/1/05.

[Figura 11] A Figura 11 é um gráfico mostrando o efeito da concentração de galatos de propila sobre o curso de tempo da atividade virótica de galatos de octila (20 mg/L) contra o vírus influenza B/T/1/05.

[Figura 12] A Figura 12 é um gráfico mostrando o curso de tempo de reforço da atividade virótica pelo uso concomitante de galatos de octila (30 mg/L) e galatos de propila (300 mg/L) contra o vírus influenza B/T/1/05.

Melhor Modo de Realizar a Invenção

A seguir, uma modalidade da invenção será descrita.

Os galatos de alquila usados na invenção podem ter um outro substituinte ou substituintes apropriados, por exemplo, um grupo alquila, um grupo cicloalquila, um grupo arila, um grupo alcóxi, um grupo éster, um grupo amida, um grupo amino, ou similares em adição ao grupo de ligação de éster entre um grupo alquila e um grupo galoila.

Exemplos específicos do grupo alquila dos galatos de alquila usados na invenção incluem um grupo n-propila, um grupo isopropila, um grupo n-butila, um grupo isobutila, um grupo n-amila, um grupo isoamila, um grupo n-hexila, um grupo n-heptila, um grupo n-octila, um grupo n-nonila, um grupo n-decila, um grupo n-undecila, um grupo n-dodecila e similares.

Os termos "antifúngico", "antiviral" e "antibacteriano" na invenção também incluem os significados de "fungicida", "viricida" e "bactericida", respectivamente.

5 Como descrito acima, a composição farmacêutica de galatos de alquila, em que o efeito do ingrediente ativo da invenção é reforçado, é essencialmente caracterizada por compreender a pluralidade de:

(A) um galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é na faixa de 5 a 16; e

10 (B) outro galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é menor do que aquele de (A). Aqui, o número de carbono do grupo alquila do galato de alquila (B) é preferivelmente na faixa de 2 a 7, e uma combinação de, por exemplo, o galato de alquila (A) em que o número de carbono do grupo alquila é na faixa de 8 a 12 e o galato de alquila (B) em que o número de carbono do grupo alquila é na faixa de 3 a 7 é preferivel-

15 mente exemplificada.

O significado da característica acima será descrito em detalhes abaixo.

Nas seguintes descrições, ND nas tabelas denota "Não Detectado", significa que o crescimento de bactéria está completamente inibido e nenhuma bactéria foi detectada.

20

1. Reforço das atividades antimicrobianas

A Tabela 1 mostra que os valores MIC (concentração de inibição de crescimento mínima) de galatos de octila contra bactérias gram-positivas e gram-negativas foram diminuídos pela adição de galatos de isoamila em uma concentração igual a, ou menor do que, a MIC na qual nenhuma atividade antimicrobiana foi observada, e que este decréscimo foi também refor-

25

çado pela adição de NaCl.

Verificou-se que fenômenos similares foram observados quando galato de n-heptila, galato de n-hexila, galato de n-pentila, galato de n-butila, galato de isobutila ou galato de n-propila (e seus tipos estruturalmente simi-

30

lares) foi adicionado em lugar de galatos de isoamila em uma concentração igual a, ou menor do que a MIC, na qual nenhuma atividade antimicrobiana

foi observada. Verificou-se também que similarmente, o volume MIC de galato de n-dodecila, galato de n-undecila, galato de n-decila, ou galato de n-nonila foi diminuído pela adição de galato de n-heptila, galato de n-hexila, galato de n-pentila, galato de n-butila, galato de isobutila ou galato de n-propila (e seus tipos estruturalmente similares) em uma concentração igual a, ou menor do que a MIC, na qual nenhuma atividade antimicrobiana foi observada.

A Tabela 2 mostra que a adição de galatos de isoamila em uma concentração igual a, ou menor do que a MIC, na qual nenhuma atividade antimicrobiana foi observada e NaCl diminuiu enormemente o volume MIC de galatos de octila contra bactérias, que foi descoberto ser muito menor do que aquele de um desinfetante existente gluconato de clorhexidina (um máximo de 640 vezes). Isto indica que galatos de octila podem ser um potente bactericida ou desinfetante.

A razão pela qual os fenômenos mencionados acima foram causados é especulada como segue. Considerando todos os dados disponíveis até agora, o ponto de ação de galatos de octila contra bactérias inclui 2 sítios, isto é, o sítio envolvido na inibição de crescimento de bactérias e o sítio que não se refere ao crescimento de bactérias. Quando os galatos de isoamila uma vez ligam-se ao último sítio, galatos de octila especificamente ligam-se apenas ao primeiro sítio envolvido no crescimento de bactérias; deste modo, é especulado que galatos de octila inibem o crescimento de bactérias em uma concentração muito baixa e diminui o volume MIC.

Com base nos resultados acima, a invenção será sumariada como segue.

As atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais de um galato de alquila (A) (em que o número de carbono da cadeia alquila é de 5 a 16) são reforçadas por outro galato de alquila (B) em que o número de carbono da cadeia alquila é menor do que aquele de galato de alquila (A) e um sal de metal de álcali tal como um sal monovalente (C) (NaCl, KCl, LiCl, NaHCO₃), ácido bórico, borato de sódio ou um sal orgânico, e desse modo o volume MIC de galato de alquila (A) pode ser diminuído.

[Table 1]

Effect of concomitant use of isoamyl gallate and NaCl on decrease of MIC of octyl gallate against a variety of bacteria														
		Octyl gallate MIC($\mu\text{g/mL}$)												
		NaCl												
		none	16	8	4									
		Isoamyl gallate												
		25		75		100		24h		24h		24h		
		none	24h	24h	none	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	
MIC sample	time													
concomitant	conc.(%)													
concomitant	conc.($\mu\text{g/mL}$)													
	<i>E. gallinarum</i> (Van C1)	62.5	ND	ND	31.25	ND	ND	ND	0.24	0.49	7.81			
	<i>E. cassellflavus</i> (VanC2/C3)	62.5	ND	ND	62.50	ND	1.95	3.91	3.91	3.91	15.63			
	<i>E. faecalis</i> 049P	62.5	ND	ND	7.81	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	<i>E. faecium</i> 067P	62.5	ND	ND	31.25	0.98	7.81	15.63	7.81	15.63	15.63			
	<i>E. faecalis</i> ATCC21212	62.5	ND	ND	7.81	ND	ND	ND	ND	ND	3.91			
	<i>E. coli</i> ATCC25922	62.5	ND	ND	0.98	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	<i>S. Typhimurium</i> IF013245	62.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	<i>S. epidermidis</i> IF037625	31.25	ND	ND	31.25	ND	ND	1.95	ND	ND	0.98			
	<i>S. epidermidis</i> ID866	31.25	ND	ND	31.25	ND	0.49	7.81	1.95	3.91	7.81			
	<i>S. marcescens</i> IAM1184	>250	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	<i>B. Subtilis</i> IF03134	31.25	ND	ND	15.63	ND	ND	≤ 0.061	ND	0.24	0.24			

Effect of concomitant use of isoamyl gallate and NaCl on decrease of MIC of octyl gallate against a variety of bacteria

Effect of concomitant use of Isoamyl gallate and NaCl on decrease of MIC of octyl gallate against a variety of bacteria																
MIC sample	Octyl gallate MIC($\mu\text{g/mL}$)															
concomitant conc.(%)	NaCl															
concomitant conc.($\mu\text{g/mL}$)	3															
	2															
	Isoamyl gallate															
none	100	75	50	45	40	35	100	75	50	25						
24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h
<i>E. gallinarum</i> (Van C1)	15.63	7.81	7.81	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63	31.25	31.25	31.25	31.25	62.50
<i>E. casseliflavus</i> (VanC2/C3)	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	62.50
<i>E. faecalis</i> 0497P	31.25	ND	0.12	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	15.63	15.63	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
<i>E. faecium</i> 0677P	62.50	15.63	15.63	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	62.50
<i>E. faecalis</i> ATCC21212	31.25	0.49	0.98	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	15.63	15.63	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
<i>E. coli</i> ATCC25922	62.50	15.63	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	62.50	62.50	62.50	62.50
<i>S. Typhimurium</i> IFO13245	31.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	ND	ND	31.25	31.25	62.50	62.50
<i>S. epidermidis</i> IFO37825	31.25	ND	0.98	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	1.95	7.81	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63
<i>S. epidermidis</i> ID866	31.25	0.49	3.91	7.81	7.81	15.63	15.63	15.63	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.98
<i>S. marcescens</i> IAM1184	0.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>250	>250	>250	>250
<i>B. Subtilis</i> IFO3134	31.25	ND	0.12	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	0.49	1.95	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	15.63

Legenda: TABELA 1

Concentração concomitante de amostra MIC (%)

Tempo de concentração concomitante ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

Efeito de uso concomitante de galato de isoamila e NaCl em decréscimo de

5 MIC de galato de octila contra uma variedade de bactéria

MIC de galato de octila ($\mu\text{g/mL}$)

Galato de isoamila

Efeito de uso concomitante de galato de isoamila e NaCl em decréscimo de

MIC de galato de octila contra uma variedade de bactéria

[Table 2]

Comparison of MIC-values of octyl gallate and chlorhexidine gluconate
In this experiment, NaCl and isoamyl gallate were added at the time of determination of MIC of octyl gallate.
in Gram (+) and Gram (-) bacteria

Gram (+) bacteria	chlorhexidine gluconate MIC ($\mu\text{g/ml}$) (A)	octyl gallate MIC ($\mu\text{g/ml}$) (B)	NaCl %	Isoamyl gallate $\mu\text{g/ml}$	A/B ratio fold
MRSA #5	0.61	0.06	4	25	10.2
MRSA #9	1.22	0.06	4	25	20.3
MRSA #17	1.22	0.06	4	50	20.3
MRSA #22	1.22	0.06	4	50	20.3
MRSA COL	1.22	0.098	4	50	12.4
MRSA Mu3	4.88	0.06	4	25	81.3
MSSA 1023	0.61	0.06	4	25	10.2
MSSA RN	0.61	0.20	4	25	3.1
<i>E. faecium</i> (VanA)	1.20	0.10	2	100	12.0
<i>E. faecalis</i> (VanB)	4.90	0.49	4	40	10.0
<i>E. gallinarum</i> (VanC1)	4.90	0.24	4	40	20.4
<i>E. casseliflavus</i> (VanC2/C3)	4.90	1.95	4	75	2.5
<i>E. faecalis</i> 0497P	2.40	0.122	3	75	19.7
<i>E. faecium</i> 0677P	1.20	0.98	4	100	1.2
<i>E. faecalis</i> ATCC21212	4.90	0.49	3	75	10.0
<i>S. epidermidis</i> IFO3762	0.60	0.98	3	75	0.6
<i>S. epidermidis</i> IID866	0.60	0.49	4	75	1.2
<i>B. subtilis</i> IFO3134	1.20	0.122	4	75	9.8
Gram (-) bacteria					
<i>S. Typhimurium</i> IFO13245	4.90	0.06	3	35	81.7
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	19.50	1.95	3	20	10.0
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	78.10	0.122	3	25	640.2
<i>E. coli</i> ATCC25922	2.40	0.98	4	0	2.4
<i>S. marcescens</i> IAM1184	9.80	0.122	3	0	80.3

Legenda: TABELA 2

Comparação de valores MIC de galato de octila e gluconato de clorhexidina
Nesta experiência, NaCl e galato de isoamila foram adicionados no momento da determinação de MIC de galato de octila.

- 5 Em bactérias Gram (+) e Gram (-)
MIC de gluconato de clorhexidina ($\mu\text{g/mL}$)
MIC de galato de octila ($\mu\text{g/mL}$)

NaCl (%)

Galato de isoamila - µg/mL

Bactérias Gram (+)

Relação A/B - dobra

5 Neste contexto, os procedimentos experimentais nos casos das tabelas 1 e 2, bem como na tabela 8 mostrada abaixo, são como segue.

A determinação da concentração de inibição de crescimento mínima (MIC) foi conduzida de acordo com o método padrão da Japanese Society of Chemotherapy (Susumu Mitsuhashi e outro, 1981; Revisão do
10 método para determinação da concentração de inibição de crescimento mínima (MIC), Chemotherapy, 29:76-79) em um Mueller Hinton II Agar (BBL) por um método de diluição serial de 2 vezes usando uma placa de ágar. Os reagentes empregados são galatos de octila (Tokyo Kasei), galatos de isoamila (Tokyo Kasei), e NaCl (Kanto Chemical Co.). Uma solução de Hibitano a
15 5% (Sumitomo Seiyaku) foi usada como um fármaco de referência. O organismo de teste foi inoculado em um caldo Mueller Hinton (DIFCO), cultivado a 37°C durante 18 horas para multiplicação, e diluída com solução salina fisiológica para 1×10^6 CFU/mL para fornecer uma solução celular para inoculação. Esta solução celular foi inoculada com um *microplanter* (Sakuma
20 Seisakusho) em uma placa de ágar suplementada com um fármaco. Após incubação a 37°C durante 24 horas, a concentração na qual o crescimento foi completamente inibido foi considerada como MIC (concentração de inibição mínima).

A Tabela 3A mostra o efeito de reforço de adição de 0,9 % (p/v)
25 de citrato de trissódio e galatos de propila sobre a atividade antimicrobial de galatos de octila contra bactérias comum (bactérias gram-positivas e gram-negativas).

É claramente mostrado que a atividade antimicrobial de galatos de octila contra bactérias comuns (bactérias gram-positivas e gram-negativas) é reforçada pela adição de 0,9 % (p/v) citrato de trissódio e gala-
30 tos de propila. Neste contexto, quando a quantidade de citrato de trissódio adicionada aumentou, o volume MIC de galatos de octila diminuiu para gala-

- tos de propila em uma menor concentração. Também no caso onde citrato de hidrogênio de dissódio foi usado em lugar de citrato de trissódio, uma tendência similar foi observada. Na tabela, MHA denota Mueller Hinton II Agar, e DDW denotas água estéril. Galatos de octila foram solubilizados com
- 5 J1816 (em uma quantidade três vezes maior do que aquela de galatos de octila) pelo método do exemplo 6 mencionado abaixo. Galatos de propila foram solubilizados pelo método do exemplo 5 mencionado abaixo.

[Table 3A]

Date		9.6.07													
MIC sample		Octyl gallate MIC($\mu\text{g/mL}$)						Octyl gallate MIC ($\mu\text{g/mL}$)							
medium		MHA						MHA (+0.9% trisodium citrate)							
concomitant	conc.($\mu\text{g/mL}$)	DDW	Propyl gallate						DDW	Propyl gallate					
		400	350	300	250	200	24h	24h	24h	400	350	300	250	200	
24h		24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	
<i>E. faecium</i> (VanA)		50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. faecalis</i> (VanB)		50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50	2.5	10	20	20	20	20
<i>E. gallinarum</i> (VanC1)		50	2.5	10	20	20	20	20	50	ND	5	10	10	20	20
<i>E. casseliflavus</i> (VanC2/C3)		50	10	20	20	50	50	50	50	0.3125	5	20	20	20	20
<i>E. faecalis</i> 0497P		50	ND	ND	ND	ND	1.25	50	50	ND	5	10	20	20	20
<i>E. faecium</i> 0677P		50	ND	ND	ND	20	20	20	50	ND	10	5	10	20	20
<i>E. faecalis</i> ATCC21212		50	ND	ND	ND	ND	20	20	50	ND	10	10	10	20	20
<i>E. coli</i> ATCC25922		50	ND	ND	ND	20	20	20	50	ND	10	10	20	20	20
<i>E. coli</i> KUE050701		>50	ND	ND	ND	ND	>50	>50	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. Typhimurium</i> IFO13245		50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. Enteritidis</i> IFO63313		>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. Enteritidis</i> DT104-3		>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. Enteritidis</i> DT104-26		>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. Oranienburg</i> 1151		>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. Infantis</i> TUS050902		>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027		>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	ND	ND	ND	ND	>50	>50
<i>P. aeruginosa</i> PAO1		>50	ND	ND	ND	ND	ND	>50	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> MHP0509-01		>50	ND	ND	ND	ND	ND	>50	>50	ND	ND	ND	ND	ND	20
<i>K. pneumoniae</i> ATCC10031		>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	ND	ND	>50	>50	>50	>50
<i>K. pneumoniae</i> KUK050801		>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>S. epidermidis</i> IFO3762		20	ND	ND	ND	ND	ND	5	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. epidermidis</i> IID866		20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. marcescens</i> IAM1184		>50	ND	ND	ND	ND	ND	>50	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>B. subtilis</i> IFO3134		50	ND	1.25	5	10	10	10	20	ND	ND	2.5	5	10	10
<i>P. mirabilis</i> IFO3849		>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. cloacae</i> IFO13535		>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MRSA C01		25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Legenda: TABELA 3A

Dados

Amostra de MIC

Meio

5 Concomitante

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)

Tempo

MIC de galato de octila ($\mu\text{g/mL}$)

Galato de propila

10 MHA (+0,9% de citrato de trissódio)

Galato de propila

A Tabela 3B mostra os volumes MICs de galatos de octila (solubilizados com J1216 pelo método do exemplo 2 mencionado abaixo) obtidos por recristalização a fim de ter uma alta pureza contra isolatos clínicos MR-SA (21 cepas) e MSSA (8 cepas). Isto revela que citrato de hidrogênio de dissódio reforça a atividade antimicrobiana de galatos de octila mais do que citrato de trissódio, e que pelo uso concomitante com 50 mg/L de galatos de propila (solubilizados pelo método do exemplo 3 mencionado abaixo), a atividade antimicrobiana de galatos de octila é significativamente reforçada e todas as cepas foram mortas com 1,25 mg/L de galatos de octila. Dos resultados destes experimentos, foi demonstrado que as impurezas de galatos de octila não mostram uma atividade antimicrobiana, porém galatos de octila por si só mostram uma atividade antimicrobiana.

A Tabela 3C mostra os volumes MICs de galatos de octila (solubilizados com J1216 pelo método do exemplo 2 mencionado abaixo) obtidos por recristalização a fim de ter uma alta pureza contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Isto revela que citrato de hidrogênio de dissódio reforça a atividade antimicrobiana de galatos de octila mais do que citrato de trissódio (a coluna à direita na tabela), e que pelo uso concomitante com 300 mg/L de galatos de propila, as bactérias, exceto para três cepas de bactérias, foram completamente mortas. Além disso, Verificou-se que pelo uso concomitante com 100 mg/L de galatos de propila, os volumes MIC de galatos de octila podem ser diminuídos (a atividade antimicrobiana de galatos de octila pode ser reforçada). Dos resultados destes experimentos, foi demonstrado que as impurezas de galatos de octila não mostram uma atividade antimicrobiana, porém galatos de octila por si só mostram uma atividade antimicrobiana contra bactérias comum.

[Table 3B]

Date	12.24.07		12.7.07	
	MIC sample	#Recrystallized octyl gallate MIC(mg/L)	#Recrystallized octyl gallate MIC(mg/L)	
medium	MHA(+0.9% disodium hydrogen citrate)*		MHA(+0.9% trisodium citrate)*	
	concomitant	DDW	Propyl gallate(dissolved at 5mg/mL in water)	Propyl gallate(dissolved at 5mg/mL in water containing 3mg/mL J-1216)
conc.(mg/L)	100		600	
	24h		24h	
time	24h		24h	
	0.625		2.5	
MRSA #1	ND		2.5	
MRSA #2	ND		2.5	
MRSA #3	ND		2.5	
MRSA #4	ND		ND	
MRSA #5	ND		ND	
MRSA #6	ND		ND	
MRSA #7	ND		ND	
MRSA #8	ND		ND	
MRSA #9	ND		ND	
MRSA #10	ND		ND	
MRSA #11	ND		ND	
MRSA #12	ND		ND	
MRSA #13	ND		ND	
MRSA #14	ND		ND	
MRSA #15	ND		ND	
MRSA #16	ND		ND	
MRSA #17	ND		ND	
MRSA #18	ND		ND	
MRSA #19	ND		ND	
MRSA #20	ND		ND	
MRSA #21	ND		ND	
MRSA #22	ND		ND	
MRSA COL	ND		ND	
MRSA Mu3	ND		ND	
MSSA 1003	ND		ND	
MSSA 1010	ND		ND	
MSSA 1020	ND		ND	
MSSA 1023	ND		ND	
MSSA 1029	ND		ND	
MSSA 1032	ND		ND	
MSSA ATC08538	ND		ND	
MSSA RN4220	ND		ND	
	24h MIC		24h MIC	
	MRSA		MRSA	
MIC Range	0.625-2.5		0.0625-5	
	ND		2.5	
MIC 50	ND		5	
MIC 100	ND		5	

Legenda: TABELA 3B

Dados

Amostra de MIC

Meio

5 # MIC de Galato de octila recristalizado (mg/L)

MHA (+0,9% de citrato de hidrogênio de dissódio)

Concentração (µg/mL)

Tempo

Galato de propila (dissolvido em 5 mg/mL em água)

10 Galato de propila (dissolvido em 5 mg/mL em água contendo 3 mg/mL de J-

5

MHA, Muller Hinton Agar

* Sodium ascorbate was added at 0.5mg/ml in the medium (Table 3B-3C).

Legenda: TABELA 3C

Dados

Amostra de MIC

Meio

5 Concomitante

MIC de Galato de octila recristalizado (mg/L)

MHA (+0,9% de citrato de hidrogênio de dissódio)

Concentração (mg/L)

Tempo

10 Galato de propila (dissolvido em 5 mg/mL em água Milli-Q)

Galato de octila (foi solubilizado com 1 mM de tampão de fosfato em pH 6,5 contendo 0,356 mg/mL de J-1816)

MIC (mg/L)

Galato de octila (dissolvido em 1 mM de tampão de fosfato envolvendo)

15 Galato de octila (dissolvido em 1 mg/mL em água Milli-Q, contendo.....)

MIC (mg/L)

Galato de propila (dissolvido em 5 mg/mL em água contendo 3 mg/mL de J-1216)

24 horas

20 Faixa de MIC

MIC 50

Galato de propila (dissolvido em água Milli-Q contendo 1,5 mg/mL

Galato de propila (dissolvido em 3 mg/mL em água Milli-Q)

MHA, Muller Hinton Ágar

25 # Galato de octila recristalizado foi disperso a 1 mg/mL em água quente a 70°C por agitação vigorosa e solubilizado adicionando 3 mg/mL de J-1216

* Ascorbato de sódio foi adicionado a 0,5 mg/ml no meio (Tabela 3B-3C)

10

Verificou-se que quando a quantidade de NaCl adicionada (2 a 4 %) aumenta, o volume MIC de galatos de octila é acentuadamente diminuído por galatos de isoamila.

[illegible]

Legenda: TABELA 4

Dados

Amostra de MIC

Concomitante

5 Concentração (%)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)MIC de Galato de octila ($\mu\text{g/mL}$)

Tempo

No = Nenhum

10 A Tabela 5 mostra o efeito de reforço de adição de 0,9% (p/v) de citrato de trissódio e galatos de propila sobre a atividade antimicrobial de galatos de octila contra fungos (mofo).

É claramente mostrado que a atividade antimicrobial de galatos de octila contra fungos (mofo) é reforçada pela adição de 0,9 % (p/v) de citrato de trissódio e galatos de propila.

15

[Table 5]

Date	2007.7.25													
MIC sample	#1 Octyl gallate MIC ($\mu\text{g/mL}$)							#1 Octyl gallate MIC ($\mu\text{g/mL}$)						
Medium	SDA							SDA (+0.9% trisodium citrate)						
Concomitant	#2 Propyl gallate							phosphate buffer (1 mM)						
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	phosphate buffer (1 mM)							phosphate buffer (1 mM)						
Time	0	24hr	48hr	150	300	500	1000	0	24hr	48hr	150	300	1000	
<i>C. albicans</i> ATCC10231	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	1000
	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10
	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10
<i>Candida</i> spp.	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	20
	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	20
	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	20
<i>S. cerevisiae</i> ATCC9763	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10
	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10
	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10
Yeast 4-1 white	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5

#1 Octyl gallate at 1 mg per ml was solubilized in 1 mM of phosphate buffer (pH 6.59) containing J1816 at 0.356 mg per ml.
 #2 Propyl gallate at 10 mg per ml was solubilized in 1 mM of phosphate buffer (pH 6.59) containing J1816 at 0.356 mg per ml.

Legenda: TABELA 5

Dados

Amostra MIC

Meio

5 Concomitante

#1 MIC de Galato de octila ($\mu\text{g/mL}$)

Tampão de fosfato

SDA (+0,9% de citrato de trissódio)

#2 Galato de Propila

5 #1 Galato de octila a 1 mg por mL foi solubilizado em 1 mM de tampão de fosfato (pH 6,59) contendo J-1816 a 0,356 mg por mL.

#1 Galato de propila a 10 mg por mL foi solubilizado em 1 mM de tampão de fosfato (pH 6,59) contendo J-1816 a 0,356 mg por mL.

10 A Figura 2 mostra uma redução do tempo requerido para matar mofo pelo uso concomitante de galatos de octila e galatos de propila contra *Candida albicans* ATCC 10231. Descobriu-se que a atividade fungicida de galatos de propila sozinho é baixa, entretanto, pelo uso concomitante com galatos de octila, o tempo requerido para matar mofo é encurtado em uma larga extensão.

15 A Tabela 6 mostra o efeito de reforço de galatos de isoamila ou galatos de propila na presença de 3% de NaCl sobre a ação antimicrobiana de galato de laurila contra *Pseudomonas aeruginosa* POA1.

Verificou-se que a ação antimicrobiana de galato de laurila contra *Pseudomonas aeruginosa* POA1 é reforçada por galatos de isoamila ou galatos de propila na presença de 3% de NaCl.

[Table 6]

Date	22.07									
MIC sample	Lauryl gallate MIC($\mu\text{g/mL}$)									
medium	MHA (3%NaCl)									
concomitant	none		Isoamyl gallate				Propyl gallate			
conc.($\mu\text{g/mL}$)	none		75				100			
time	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	15.625	31.25	ND	0.9766	ND	3.9063	ND	ND	ND	0.4883

Legenda: TABELA 6

Dados

Amostra de MIC

Meio

5 Concomitante

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)

Tempo

MIC de galato de laurila ($\mu\text{g/mL}$)

MHA (3% de NaCl)

10 Galato de Isoamila

Galato de propila

Tempo

24 horas

48 horas

5 A Tabela 7 mostra o efeito de reforço de galatos de isoamila sobre a ação antimicrobiana de galatos de octila contra isolatos clínicos MRSA e MSSA.

10 A Tabela 7 mostra que a ação antimicrobiana de galatos de octila contra isolatos clínicos MRSA e MSSA é reforçada por galatos de isoamila. Galatos de octila e galatos de isoamila foram solubilizados com J1816 em uma quantidade de 3,5 vezes (relação de peso) maior do que aquela para galato de alquila.

[Table 7]

Date		3.8.07											
MIC sample		Octyl gallate MIC($\mu\text{g/mL}$)											
medium		CAMHA											
concomitant		J-1816						Isoamyl gallate					
conc. ($\mu\text{g/mL}$)		262.5			50			25			25		
time		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
	MRSA #1	25	50	ND	12.5	ND	12.5	ND	12.5	ND	12.5	ND	25
	MRSA #2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.3906	12.5	ND	ND	25
	MRSA #3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≤ 0.0244	≤ 0.0244	≤ 0.0244	≤ 0.0244	ND
	MRSA #4	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.25	12.5	ND	12.5
	MRSA #5	ND	6.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	3.125	ND	12.5
	MRSA #6	ND	1.5625	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	12.5	ND	12.5
	MRSA #7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	≤ 0.0244	≤ 0.0244	6.25	ND	12.5
	MRSA #8	ND	25	ND	ND	ND	ND	ND	0.3906	6.25	ND	ND	12.5
	MRSA #9	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	1.5625	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #10	0.3906	6.25	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #12	ND	ND	≤ 0.0244	≤ 0.0244	ND	ND	ND	12.5	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #16	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	6.25	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #17	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #18	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	12.5	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #19	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.5625	6.25	ND	ND	12.5
	MRSA #21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.5	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA #22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.5	12.5	ND	ND	25
	MRSA COL	ND	0.7813	ND	0.1953	ND	0.1953	ND	6.25	25	ND	ND	25
	MRSA #13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	12.5	ND	ND	12.5
	MRSA Mu3	25	25	ND	ND	ND	ND	ND	0.0488	12.5	ND	ND	12.5
	MSSA 1003	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.3906	3.125	12.5	ND	12.5
	MSSA 1010	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	12.5	ND	ND	12.5
	MSSA 1020	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.125	6.25	ND	ND	12.5
	MSSA 1023	ND	25	ND	ND	ND	ND	ND	1.5625	12.5	ND	ND	12.5
	MSSA 1029	ND	12.5	ND	ND	ND	ND	ND	12.5	12.5	ND	ND	12.5
	MSSA 1032	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.5	12.5	ND	ND	12.5
	MSSA ATCC	ND	50	ND	1.56	ND	1.56	ND	12.5	25	ND	ND	12.5
	MSSA RN	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.195	12.5	ND	ND	12.5

Legenda: TABELA 7

Dados

Amostra de MIC

Meio

Concomitante

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)

Tempo

5 MIC de galato de octila ($\mu\text{g/mL}$)

Galato de Isoamila

2. Reforço adicional do efeito de realce da sensibilidade de β -lactam ao MRSA por galatos de alquila

Verificou-se que os galatos de alquila realçam a sensibilidade de β -lactamas ao MRSA (PCT/JP2004/000751); além disso, descobriu-se que este efeito de realce pode também ser reforçado na coexistência de um galato de alquila em que o número de carbono da cadeia alquila é menor do que aquele de galatos de octila. A Tabela 8 e a Tabela 9 mostram exemplos de galatos de propila e galatos de isoamila em uma concentração na qual nenhuma atividade antimicrobiana é observada, porém na coexistência destes galatos, um decréscimo do volume MIC de oxacilina para MRSA ocorre por galatos de octila em uma concentração tão baixa quanto $1,56 \mu\text{g/mL}$.

[Table 8]

9.10.06																	
Oxacillin MIC (μg/mL)																	
24h	Isoamyl G or Propyl G				Isoamyl G (μg/mL)				Propyl G (μg/mL)								
	none				25				12.5				6.25				
	Octyl G (μg/mL)				Octyl G (μg/mL)				Octyl G (μg/mL)				Octyl G (μg/mL)				
	none	12.5	6.25	3.125	1.5625	3.125	1.5625	none	3.125	1.5625	none	12.5	6.25	3.125	1.5625	none	
	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	24h	
	128	4	16	32	64	30.053	0.125	0.125	0.125	32	8	32	16	32	16	128	64
MRSA #8	64	1	2	8	32	0.125 <td>0.125<td>0.5</td><td>4</td><td>2</td><td>8</td><td>1</td><td>2</td><td>16</td><td>32</td><td>32</td><td>1</td></td>	0.125 <td>0.5</td> <td>4</td> <td>2</td> <td>8</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>16</td> <td>32</td> <td>32</td> <td>1</td>	0.5	4	2	8	1	2	16	32	32	1
MRSA COL	256	1	16	64	64	0.125 <td>0.125<td>0.25<td>32</td><td>4</td><td>8</td><td>4</td><td>16</td><td>8</td><td>128</td><td>128</td><td>0.5</td></td></td>	0.125 <td>0.25<td>32</td><td>4</td><td>8</td><td>4</td><td>16</td><td>8</td><td>128</td><td>128</td><td>0.5</td></td>	0.25 <td>32</td> <td>4</td> <td>8</td> <td>4</td> <td>16</td> <td>8</td> <td>128</td> <td>128</td> <td>0.5</td>	32	4	8	4	16	8	128	128	0.5
MRSA M-3	512	32	64	256	512	0.25 <td>0.25<td>0.5</td><td>64</td><td>64</td><td>256</td><td>64</td><td>128</td><td>64</td><td>128</td><td>256</td><td>4</td></td>	0.25 <td>0.5</td> <td>64</td> <td>64</td> <td>256</td> <td>64</td> <td>128</td> <td>64</td> <td>128</td> <td>256</td> <td>4</td>	0.5	64	64	256	64	128	64	128	256	4

Legenda: TABELA 8

MIC de oxacilina (µg/mL)

Galato de isoamila (µg/mL)

Galato de isoamila ou Galato de propila

5 Nenhum

Galato de Octila

Nenhum

24 horas

[Table 9]

48h	9,10,05												9,10,36												
	Oxacillin MIC (µg/mL)												Oxyl galate MIC (µg/mL)												
	Isoamyl G or Propyl G						Isoamyl G						Isoamyl G						Isoamyl G						
	none			Octyl G			Octyl G			Octyl G			none			Octyl G			Octyl G			none			
	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	
MRSA #1	512	64	128	128	256	8	8	16	128	128	256	256	64	256	64	256	256	32	32	MRSA #1	3.906	3.906	3.906	48h	
MRSA #2	256	16	32	32	64	1	2	4	64	32	128	64	64	64	64	64	64	1	1	MRSA #2	0.4883	0.4883	0.4883	48h	
MRSA #3	128	2	8	16	32	0.5	0.5	0.25	32	10	32	64	64	64	64	64	64	1	1	MRSA #3	0.4883	0.4883	0.4883	48h	
MRSA #4	256	32	64	64	128	16	5	8	64	64	256	256	128	128	128	128	128	8	8	MRSA #4	15.625	15.625	15.625	48h	
MRSA #5	256	32	64	64	128	0.5	1	1	32	32	64	64	64	64	64	64	64	1	1	MRSA #5	0.4883	0.4883	0.4883	48h	
MRSA #6	128	16	32	32	64	0.5	1	1	32	32	64	64	64	64	64	64	64	1	1	MRSA #6	1.953	1.953	1.953	48h	
MRSA #7	256	32	128	128	256	1	0.5	1	128	32	128	128	128	256	256	4	4	4	4	MRSA #7	31.25	31.25	31.25	48h	
MRSA #8	128	8	32	64	64	0.125	0.125	0.25	64	8	64	64	64	64	64	32	128	128	1	1	MRSA #8	0.2441	0.2441	0.2441	48h
MRSA #9	256	128	128	128	256	4	2	5	128	128	256	256	256	256	256	256	256	4	4	MRSA #9	0.9766	0.9766	0.9766	48h	
MRSA #10	128	8	16	16	32	0.5	1	2	16	16	32	16	16	16	16	32	64	64	4	4	MRSA #10	ND	ND	ND	48h
MRSA #12	256	16	32	64	64	4	2	2	32	32	64	32	64	128	128	4	4	4	4	MRSA #12	31.25	31.25	31.25	48h	
MRSA #16	256	32	64	64	64	0.5	1	1	32	16	64	32	32	128	128	2	2	2	2	MRSA #16	0.4883	0.4883	0.4883	48h	
MRSA #17	128	16	32	32	64	1	2	2	32	16	64	32	32	64	64	4	4	4	4	MRSA #17	7.8125	7.8125	7.8125	48h	
MRSA #18	256	32	64	128	128	16	8	32	64	64	128	256	128	128	256	128	8	8	8	MRSA #18	15.625	15.625	15.625	48h	
MRSA #19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	MRSA #19	ND	ND	ND	48h	
MRSA #20	64	4	8	4	16	0.125	0.25	0.5	8	2	8	8	16	32	32	32	32	0.5	1	MRSA #20	0.2441	0.2441	0.2441	48h	
MRSA #21	64	0.5	4	16	32	0.5	1	16	8	16	16	16	16	32	64	32	1	0.5	0.5	MRSA #21	31.25	31.25	31.25	48h	
MRSA #22	64	2	8	8	16	0.25	0.25	1	15	4	8	16	16	16	16	32	32	0.5	0.5	MRSA #22	0.2441	0.2441	0.2441	48h	
MRSA COL	256	4	32	64	64	0.25	0.25	1	32	4	32	16	32	32	128	128	1	1	1	MRSA COL	0.4883	0.4883	0.4883	48h	
MSSA 1003	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.125	0.125	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	MSSA 1003	0.1271	0.1271	0.1271	48h	
MSSA 1010	0.5	0.125	0.25	0.5	0.5	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	MSSA 1010	0.9766	0.9766	0.9766	48h	
MSSA 1020	2	0.5	1	2	2	0.25	0.25	0.5	1	1	2	0.5	1	2	2	2	2	0.5	0.5	MSSA 1020	31.25	31.25	31.25	48h	
MSSA 1023	8	4	4	4	8	0.5	0.5	1	8	2	4	4	4	4	4	4	4	8	8	MSSA 1023	0.2441	0.2441	0.2441	48h	
MSSA 1029	2	0.5	1	2	2	0.25	0.25	0.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	MSSA 1029	ND	ND	ND	48h	
MSSA 1032	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	MSSA 1032	0.4883	0.4883	0.4883	48h	
MSSA ATCC	0.125	0.0625	0.125	0.125	0.125	0.0625	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	MSSA ATCC	31.25	31.25	31.25	48h	
MSSA RN	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.125	0.125	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	MSSA RN	0.9766	0.9766	0.9766	48h	
MRSA #13	256	16	128	128	256	1	1	2	128	64	128	128	128	128	128	128	128	8	8	MRSA #13	31.25	31.25	31.25	48h	
MRSA Mu3	512	64	256	256	512	1	0.25	8	128	64	256	256	256	256	256	128	128	128	128	MRSA Mu3	33.009	33.009	33.009	48h	

This time, in several cases, the growth of bacterium was once inhibited, then began again at a higher concentration, and then inhibited again.

MIC was determined at a concentration at which the bacterium did not grow again.

When the inhibition of growth was observed at a lower concentration than MIC, the growth inhibition concentration at the lowest concentration was indicated in the left column of "Range of inhibition concentration", and the inhibition concentration immediately before the growth of bacterium began again was indicated in the right column.

Legenda: TABELA 9

MIC de oxacilina (µg/mL)

Galato de isoamila (µg/mL)

Galato de isoamila ou Galato de propila

5 Nenhum

Galato de Octila

Nenhum

48 horas

MIC de Galato de Octila

5 Este tempo, em diversos casos, o crescimento de bactéria foi uma vez inibido, em seguida começou novamente em uma concentração maior, e em seguida inibido novamente.

A MIC foi determinada em uma concentração na qual a bactéria não se desenvolveu novamente.

10 Quando a inibição de crescimento foi observada em uma concentração menor do que a MIC, a concentração de inibição de crescimento na menor concentração foi indicada na coluna à esquerda de "Faixa de Concentração de Inibição", e a concentração de inibição imediatamente antes do crescimento de bactéria começar novamente, foi indicado na coluna à direita.

15 A Tabela 10 mostra o volume MIC de oxacilina quando ela foi usada sozinha e o volume MIC de oxacilina quando ela foi usada concomitantemente com galatos de octila para o MRSA de isolato clínico.

20 Para ser mais específico, o volume MIC de oxacilina quando ela foi usada sozinha e o volume MIC de oxacilina quando ela foi usada concomitantemente com galatos de octila determinado pelo método de diluição de placa de ágar de 2 vezes seriais são mostrados para as respectivas cepas de bactérias testadas. Um efeito de ILSMR pode ser confirmado em diversas cepas de bactérias quando o uso concomitante de galatos de octila a 12,5 µg/mL, e um efeito inibitório de crescimento foi observado em todas as cepas bacterianas com apenas galatos de octila com o uso concomitante de
25 galatos de octila a 25 µg/mL.

[Table 10]

Oxacillin MIC against clinical isolate MRSA when oxacillin was used alone and when oxacillin was used concomitantly with octyl gallate

Strain	Oxacillin MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	Octyl gallate ($\mu\text{g/mL}$)			
	None	25	12.5	6.25
MRSA #1	512	ND	128	256
MRSA #2	256	ND	128	128
MRSA #3	128	ND	64	128
MRSA #4	256	ND	128	256
MRSA #5	256	ND	128	256
MRSA #6	128	ND	32	64
MRSA #7	256	ND	256	256
MRSA #8	256	ND	64	128
MRSA #9	256	ND	128	256
MRSA #10	128	ND	64	128
MRSA #12	256	ND	128	256
MRSA #13	256	ND	128	256
MRSA #16	256	ND	128	256
MRSA #17	256	ND	64	128
MRSA #18	256	ND	256	256
MRSA #19	256	ND	128	256
MRSA #20	32	ND	4	32
MRSA #21	64	ND	16	64
MRSA #22	64	ND	16	32
MRSA COL	512	ND	128	256
MRSA Mu3	512	ND	256	512

Legenda: TABELA 10

MIC de oxacilina contra MRSA de isolato clínico quando a oxacilina foi usada sozinha e quando a oxacilina foi usada concomitantemente com galato de octila.

5 Cepa

MIC de Oxacilina ($\mu\text{g/mL}$)

Galato de Octila ($\mu\text{g/mL}$)

Nenhum

A Tabela 11 mostra as concentrações de galatos de octila necessárias para obter um valor MIC de oxacilina não maior do que 2 µg/mL quando oxacilina foi usada concomitantemente com galatos de octila para as respectivas cepas bacterianas. Para ser mais específico, a tabela mostra o caso onde oxacilina foi usada concomitantemente apenas com galatos de octila sem a coexistência de um galato de cadeia curta e o caso onde oxacilina foi usada concomitantemente com galatos de isoamila ou galatos de propila em adição a galatos de octila. Verificou-se que quando 25 µg/mL de galatos de isoamila são permitidos coexistir, o uso concomitante de galatos de octila a 1,56 µg/mL é suficiente a fim de obter MIC de oxacilina de 2 µg/mL.

[Table 11]

Strain	Concentration of octyl gallate for concomitant use necessary for obtaining oxacillin MIC not higher than 2 µg/mL (µg/mL)	Isoamyl gallate(µg/mL)			Propyl gallate(µg/mL)		
		None			25		
		25	12.5	6.25	25	12.5	6.25
MRSA #1	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #2	25	1.56	12.5	>12.5	3.13	>12.5	>12.5
MRSA #3	25	1.56	>12.5	>12.5	3.13	>12.5	>12.5
MRSA #4	25	1.56	>12.5	>12.5	ND	ND	ND
MRSA #5	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #6	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #7	25	1.56	12.5	>12.5	3.13	>12.5	>12.5
MRSA #8	25	1.56	6.25	>12.5	3.13	>12.5	>12.5
MRSA #9	25	1.56	12.5	>12.5	3.13	>12.5	>12.5
MRSA #10	25	1.56	1.56	6.25	3.13	>12.5	>12.5
MRSA #12	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #13	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #16	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #17	25	1.56	12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #18	25	1.56	>12.5	>12.5	ND	ND	ND
MRSA #19	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5
MRSA #20	25	1.56	1.56	>12.5	3.13	>12.5	>12.5
MRSA #21	25	1.56	6.25	>12.5	1.56	6.25	12.5
MRSA #22	25	1.56	6.25	>12.5	1.56	6.25	12.5
MRSA COL	25	1.56	>12.5	>12.5	1.56	12.5	12.5
MRSA Mu3	25	1.56	>12.5	>12.5	6.25	>12.5	>12.5

Legenda: TABELA 11

Efeito de reforço de uso concomitante de galato de octila na presença de

galato de alquila de cadeia curta sobre a sensibilidade de oxacilina a MRSA de isolato clínico.

Cepa

Nenhum

5 Galato de isoamila ($\mu\text{g/mL}$)

Galato de propila ($\mu\text{g/mL}$)

Nenhum

Concentração de galato de octila por uso concomitante necessário para obter a MIC de oxacilina não maior do que $2 \mu\text{g/mL}$ (mg/mL)

- 10 A Tabela 12 mostra um efeito de uso concomitante de um galato de alquila de cadeia curta sobre efeito de reforço de galatos de octila sobre a sensibilidade da oxacilina ao MRSA isolato clínico, e as concentrações de galatos de octila necessárias para obter um valor MIC de oxacilina não maior do que $2 \mu\text{g/mL}$ mostrado na tabela 7 são sumariadas na tabela 12 em termos de faixa, C_{50} e C_{100} . C_{50} e C_{100} denotam as concentrações de galatos de octila para uso concomitante, que obtêm 50% e 100% de inibição de crescimento de cepas bacterianas por oxacilina a $2 \mu\text{g/mL}$ ou menor, respectivamente. Quando galatos de propila foram permitidos coexistir a $25 \mu\text{g/mL}$, 100% de inibição de crescimento de cepa de MRSA foram obtidos por oxacilina a $2 \mu\text{g/mL}$ ou menor com o uso concomitante de galatos de octila a $6,25 \mu\text{g/mL}$. Quando galatos de isoamila foram permitidos coexistir a $25 \mu\text{g/mL}$, 100% de inibição de crescimento de cepa de MRSA foram obtidos por oxacilina a $2 \mu\text{g/mL}$ ou menor com o uso concomitante de galatos de octila a $1,56 \mu\text{g/mL}$. Neste contexto, um valor MIC de oxacilina de $2 \mu\text{g/mL}$ é usado como um índice para a cepa sensível (MSSA).
- 15
- 20
- 25

[Table 12]

Effect of concomitant use of short-chain alkyl gallate on activity of reinforcing oxacillin sensitivity to clinical isolate MRSA by octyl gallate			
Conc.	Concentration of octyl gallate for concomitant use necessary for obtaining oxacillin MIC not higher than 2 µg/mL (µg/mL)		C ₁₀₀
	Range	C ₅₀	
None	25	25	25
Propyl gallate	12.5 - >12.5	>12.5	>12.5
	6.25 - 12.5	>12.5	>12.5
	1.56 - 6.25	3.13	6.25
Isoamyl gallate	6.25 - >12.5	>12.5	>12.5
	1.56 - >12.5	>12.5	>12.5
	1.56	1.56	1.56

Legenda: TABELA 12

Efeito de uso concomitante de galato de alquila de cadeia curta sobre a atividade de reforço da sensibilidade de oxacilina a MRSA de isolato clínico por galato de octila.

- Concentração de galato de octila por uso concomitante necessário para obter a MIC de oxacilina não maior do que 2 µg/mL (µg/mL).

3. Reforço de atividade viricida e atividade antiviral

1) Reforço de atividade viricida (Figura 3)

O círculo aberto na Figura 3 indica o efeito viricida da influenza de galatos de dodecila sozinho. O efeito na coexistência de 100 µg/ml de galato de hexila é indicado pelo quadrado aberto na Figura 3; deste modo, o efeito viricida de galatos de dodecila foi acentuadamente reforçado e nenhum sobrevivente foi observado mesmo a 20 µg/ml. Este efeito viricida de galatos de dodecila foi também reforçado acentuadamente pela adição de galato de butila (triângulo aberto) em uma concentração na qual nenhum efeito viricida foi observado. Como um resultado de elucidação de diversas maneiras, foi revelado que a atividade viricida de galato de alquila A (em que o número de carbono da cadeia alquila foi 5 a 16) foi reforçada por galato de alquila B em que o número de carbono da cadeia alquila foi menor do que aquele de galato de alquila A.

2) Reforço de atividade antiviral (Figura 4)

Galato de octila inibe o crescimento de vírus influenza em células MDCK; esta inibição de crescimento foi acentuadamente reforçada por galatos de propila em uma concentração na qual nenhuma atividade antiviral foi observada.

Como um resultado de elucidação de diversas maneiras, foi revelado que a atividade antiviral de galato de alquila A (em que o número de carbono da cadeia alquila foi de 5 a 16) foi reforçada por galato de alquila B em que o número de carbono da cadeia alquila foi menor do que aquele de galato de alquila A.

A Tabela 13 indica as bactérias-alvo, fungos e viroses da invenção.

[Table 13]

Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	Viruses
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bartonella henselae</i>	Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	Cytomegalovirus (CMV)
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Corona virus
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Borrelia recurrentis</i>	Dengue Virus
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Brucella suis</i>	Ebola Virus
<i>Clostridium tetani</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Enteroviruses (poliovirus)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Easton-Burn Virus
Enterococci	<i>Campylobacter jejuni</i>	Hantavirus
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Hepatitis A Virus (HAV)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Hepatitis B Virus (HBV)
<i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase positive)	<i>Escherichia coli</i>	Hepatitis C Virus (HCV)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (coagulase negative)	<i>Francisella tularensis</i>	Herpes Simplex Virus (HSV) 1 & 2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Human Immunodeficiency Virus (HIV)
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Human Papillomavirus (HPV)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Influenza Virus
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	Measles Virus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Mumps Virus
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nipah Virus
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	Noro virus
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Neisseria multocida</i>	Rabies Virus
<i>Propionibacterium granulosus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Respiratory Syncytial Virus (RSV)
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Rhinovirus
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Rubella Virus
	<i>Salmonella enteritidis</i>	SARS Corona virus
	<i>Salmonella typhi</i>	Varicella-Zoster Virus
	<i>Shigella sonnei</i>	West Nile Virus
	<i>Treponema pallidum</i>	Yellow Fever Virus
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	
	<i>Vibrio cholerae</i>	Fungi
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton)
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
		<i>Pneumocystis carinii</i>
		<i>Sporothrix schenckii</i>

Legenda: TABELA 13

Viroses

Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE)

Doença Creutzfeldt-Jakob

5 Citomegalovírus

Corona Vírus

- Vírus da Dengue
- Vírus Ebola
- Enteroviroses (poliovírus)
- Vírus Epstein-Barr
- 5 Hentavírus
- Vírus da Hepatite A (HAV)
- Vírus da Hepatite B (HBV)
- Vírus da Hepatite C (HCV)
- Vírus do Herpes Simples (HSV) 1 & 2
- 10 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)
- Papilomavírus Humano (HPV)
- Vírus da Influenza
- Vírus do Sarampo
- Vírus da Cachumba
- 15 Vírus *Nipah*
- Vírus *Noro*
- Vírus da raiva
- Vírus Sincicial Respiratório (RSV)
- Rinovírus
- 20 Vírus da Rubéola
- Corona Vírus SARS
- Vírus Varicela-Zóster
- Vírus West Nile
- Vírus da Febre Amarela
- 25 Fungos
- Dermatófitos

As Tabelas 14 a 16 mostram que a atividade viricida de galatos de octila contra o herpes vírus (HSV-1) e vírus influenza foi acentuadamente reforçada pela adição de J1816 e galatos de propila.

- 30 Na coexistência de 6 mg/L de J1816, o HSV-1 perdeu completamente a infectividade às células devido aos galatos de octila a 2 mg/L (20 mg/L na ausência de J1816). Similarmente, também no caso do vírus influ-

enza, na presença de 30 mg/L de J1816, o vírus influenza perdeu completamente a infectividade às células devido aos galatos de octila a 10 mg/L (60 mg/L na ausência de J1816). Consequentemente, verificou-se que a atividade viricida de galatos de octila contra o herpes vírus (HSV-1) e vírus influenza foi acentuadamente reforçada pela adição de J1816.

[Table 14]

Virucidal activity against HSV-1 by the coexistence of octyl gallate, J1816 and propyl gallate

#1 octyl gallate (mg/L)	#2 propyl gallate (mg/L)	J1816 (mg/L)	Na3citrate	No of plaques
0		0	0.90%	182
10		30	0.90%	0
20		60	0.90%	0
30		90	0.90%	0
60		180	0.90%	0
100		300	0.90%	0
0		300	0.90%	0
10		300	0.90%	0
20		300	0.90%	0
30		300	0.90%	0
60		300	0.90%	0
100		300	0.90%	0
		0	0.90%	128
		100	0.90%	0
		200	0.90%	0
		300	0.90%	0
		400	0.90%	0
		500	0.90%	0
60		180		0
		150	0.90%	0
		300	0.90%	0

#1: Octyl gallate (1mg/ml) was solubilized in 1mM phosphate buffer containing 3 mg/ml of J1816.

#2: Propyl gallate (5mg/ml) was solubilized in 5mM phosphate buffer containing 1.5 mg/ml of J1816

Legenda: TABELA 14

Atividade Viricida contra HSV-1 pela coexistência de galato de octila, J1816 e galato de propila.

#1 Galato de Octila (mg/L)

#2 Galato de Propila (mg/L)

J1816 (mg/L)

Citrato de Na3

Nº de placas

- 5 #1 Galato de octila (1 mg/ml) foi solubilizado em 1 mM de tampão de fosfato contendo 3 mg/ml de J1816.

#2 Galato de propila (5 mg/ml) foi solubilizado em 5 mM de tampão de fosfato contendo 1,5 mg/ml de J1816.

[Table 15]

Virucidal activity against HSV-1 by the coexistence of octyl gallate and propyl gallate

#3octyl gallate (mg/L)	propyl gallate (mg/L)	J1816 (mg/L)	NaCitrato	No of plaques
0		0	0.90%	158
10		0	0.90%	48
20		0	0.90%	0
30		0	0.90%	0
60		0	0.90%	0
100		0	0.90%	0
0	300	0	0.90%	137
10	300	0	0.90%	11
20	300	0	0.90%	0
30	300	0	0.90%	0
60	300	0	0.90%	0
100	300	0	0.90%	0
	0	0	0.90%	150
	100	0	0.90%	192
	200	0	0.90%	139
	300	0	0.90%	162
	400	0	0.90%	102
	500	0	0.90%	130

#3: Octyl gallate was solubilized with 1M Arginine

#4: Propyl gallate (3mg/ml) was solubilized in 5mM phosphate buffer at pH 6.71

Legenda: TABELA 15

- 10 Atividade viricida contra HSV-1 pela coexistência de galato de octila e galato de propila

#3 Galato de octila (mg/L)

Galato de Propila (mg/L)

J1816 (mg/L)

Citrato de Na

N° de Placas

#3 Galato de octila foi solubilizado com 1M de arginina

#4 Galato de propila (3 mg/ml) foi solubilizado em 5 mM de tampão de fosfa-

5 to a pH 6,71

[Table 16]

Virucidal activity against influenza virus A/Aichi (H3N2)
by the coexistence of octyl gallate, J1816 and propyl gallate

	#1octyl ga	#2propyl galte (mg/L)	J1816 (mg/L)	NaCitrato	No of plaques		
1	0		0	0.90%	256	244	248
2	20		60	0.90%	0		
3	40		120	0.90%	0		
4	60		180	0.90%	0		
5	80		240	0.90%	0		
6	100		300	0.90%	0		
7	0	300	90	0.90%	52		
8	20	300	150	0.90%	0		
9	40	300	210	0.90%	0		
10	60	300	270	0.90%	0		
11	80	300	330	0.90%	0		
12	100	300	390	0.90%	0		
13		0	0	0.90%	214		
14		100	30	0.90%	84		
15		200	60	0.90%	87		
16		300	90	0.90%	53		
17		400	120	0.90%	47		
18		500	150	0.90%	42		
19	60		180		0		
20			50		118		
21			100		100		
22			150		84		
23			200		78		
24			300		88		
25			400		—		
26			500		76		

#1: Octyl gallate (1mg/ml) was solubilized in 1mM phosphate buffer containing 3 mg/ml of J1816.

#2: Propyl gallate (5mg/ml) was solubilized in 5mM phosphate buffer containing 1.5 mg/ml of J1816

Legenda: TABELA 16

Atividade viricida contra o vírus da Influenza A / Aichi (H3N2) pela coexistência de galato de octila, J1816 e galato de propila.

#1 galato de octila

10 #2 galato de propila (mg/L)

J1816 (mg/L)

Citrato de Na

N° de placas

#1 Galato de octila (1 mg/ml) foi solubilizado em 1 mM de tampão de fosfato contendo 3 mg/ml de J1816.

#2 Galato de propila (5 mg/ml) foi solubilizado em 5 mM de tampão de fosfato contendo 1,5 mg/ml de J1816.

5 A Figura 5 mostra que um reforço acentuado de atividade viricida de galatos de octila contra HSV-1 foi observado por 60 mg/L de galatos de propila.

10 A Figura 6 mostra uma redução do tempo requerido para matar viroses pelo uso concomitante de galatos de octila e galatos de propila contra influenza B/T/1/05. Descobriu-se que a atividade viricida de galatos de propila sozinho é baixa, entretanto, pelo uso concomitante de galatos de octila, o tempo requerido para matar viroses é encurtado em uma larga extensão.

15 Os experimentos nas Figuras 7 a 12 foram realizados a 37°C. A infectividade de viroses foi determinada usando células de MDCK pelo método de ensaio de placa .

20 Verificou-se que a partir da Figura 7, os galatos de octila têm uma atividade viricida contra o vírus influenza B/T/1/05, e a partir da Figura 8, galatos de propila têm uma baixa atividade viricida. Entretanto, as Figuras 9 a 12 mostram que a atividade viricida de galatos de octila é acentuadamente reforçada pelo uso concomitante com galatos de propila. Além disso, na Figura 12, verificou-se que pelo uso concomitante de ambos os compostos, perdeu a infectividade às células dentro de 1 minuto, portanto, pode-se esperar que um agente viricida extremamente potente seja formado. Esta
25 atividade viricida de galatos de octila foi reforçada por galatos de propila também contra vírus influenza A/Aichi (H₃N₂) da mesma maneira como acima.

4. Escopo de aplicação

30 Tendo potentes efeitos antifúngicos, antibacterianos, antivirais com baixa toxicidade, uma ampla variedade das seguintes aplicações com relação a produtos farmacêuticos, agroquímicos (animais domésticos, peixes de chocadeira, animais de estimação, plantas), produtos funcionais alimenta-

res e cosméticos são possíveis.

- 1) Esterilização e desinfecção externas gerais (desinfecção de instrumentos cirúrgicos e instrumentos médicos, desinfecção de facilidades de cuidados médicos, desinfecção das mãos), prevenção de infecção em ambientes hospitalares
- 2) Campo otolaringológico (erradicação de MRSA intranasal, e similares)
- 3) Campo dermatológico (prevenção e terapia de escara, queimadura térmica e acne, eliminação de odor corporal), cosméticos para cura da acne, xampu e xampu corporal, e similares
- 4) Campo dentário oral (prevenção e terapia de resfriado comum, prevenção e terapia de faringite, terapia e prevenção de cáries dentárias, terapia e prevenção de periodontite, eliminação e prevenção de halitose, terapia e prevenção de estomatite); gargarejo, pó dentifício médico, antisséptico bucal
- 5) Campo oftálmico (terapia e prevenção de infecção bacteriana, fúngica ou viral, esterilização e desinfecção de lentes de contato); colírios, desinfetantes
- 6) Campo ginecológico (agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, artigos sanitários, viricidas para HIV e similares)
- 7) Campo de envenenamento alimentar (terapia e prevenção de envenenamento alimentar causado por *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Salmonella*, *Echerichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas Sobria*, *Plesimonas shigelloides*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Norovirus*, e similares); agentes terapêuticos e preventivos de envenenamento alimentar
- 8) Agentes terapêuticos para pneumonia (terapia e prevenção de pneumonia causada por *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacteria tuberculosis*, uma variedade de viroses), terapia e prevenção por inalação.

9) Produtos alimentares funcionais (eliminação de halitose ou prevenção e terapia de resfriado comum e estomatite por adição à goma ou similares)

Exemplos da via de administração da composição farmacêutica tendo um efeito antifúngico, antiviral ou antibacteriano da invenção incluem administração parenteral, administração oral, administração local, e similares da mesma maneira que em antibióticos usuais. Em geral, a administração por injeção é preferida. Em tal caso, a injeção pode ser preparada de uma maneira convencional, e um caso onde os ingredientes são dissolvidos em um veículo apropriado, por exemplo, água destilada esterilizada, solução salina fisiológica, ou similares, como uma forma de injeção é também incluído.

A administração oral é também tolerável em várias formas de dosagem. Por exemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos revestidos com açúcar ou similares, e soluções ou suspensões líquidas são incluídos em tais formas.

A dose do ingrediente ativo mencionado acima usada para prevenção ou terapia pode ser mudada dependendo da idade, peso corporal, condição do paciente, e via de administração; por exemplo, o ingrediente ativo pode ser administrado oralmente em uma dose de 1 mg a 3 g (por 1 kg de peso corporal) 1 a 3 vezes ao dia para adultos. A fim de obter o melhor efeito terapêutico, a dose e a via de administração são mudadas.

As composições farmacêuticas da invenção são habitualmente preparadas de acordo com um método convencional e formuladas em uma forma farmacêuticamente adequada. Por exemplo, uma formulação sólida pode conter juntamente com um composto ativo um diluente tal como lactose, dextrose, sacarose, celulose, amido de milho ou amido de batata; um lubrificante tal como sílica, talco, ácido esteárico, estearato de magnésio ou estearato de cálcio e/ou polietileno glicol; um agente de ligação tal como amido, goma arábica, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou polivinilpirrolidina; um desintegrador tal como amido, ácido algínico, um alginato ou sódio de amido de ácido glicólico; um agente espumante; um pigmento; um

adoçante; um agente umectante tal como lecitina, polissorbato, ou sulfato de laurila; e uma substância farmacêuticamente inativa, farmacêuticamente prescrita e geralmente não-tóxica. Estas composições farmacêuticas podem ser produzidas de acordo com um processo conhecido, por exemplo, processo de mistura, granulação, formação de comprimido, revestimento de açúcar, revestimento ou similares.

Em administração parenteral, a formulação mais amplamente usada é de injeção, através de supositórios direcionados para o reto pode também ser empregada. As preparações para injeção incluem aquelas diferentes em aparência externa, tais como preparações líquidas, preparações que se dissolvem imediatamente antes do uso, e preparações tipo suspensão, porém basicamente elas são consideradas ser as mesmas, porque um ingrediente ativo é esterilizado de uma maneira apropriada, em seguida colocado diretamente em um vaso, e hermeticamente fechado nele.

Como um dos métodos mais simples para preparar uma formulação, existe um método em que um ingrediente ativo é esterilizado de uma maneira apropriada, em seguida misturado separadamente ou fisicamente, e uma certa quantidade da mistura resultante é dividida para produzir uma formulação. Quando uma forma líquida for escolhida, um método em que um ingrediente ativo é dissolvido em um veículo apropriado, esterilizado por filtração, colocado em ampolas ou frascos apropriados, e firmemente fechado neles, pode ser empregado.

Neste caso, o veículo mais frequentemente usado é água destilada para injeção, porém a invenção não está restrita a ela. Se requerido, é possível adicionar um agente calmante tendo uma ação anestésica local tal como cloridrato de procaína, cloridrato de xilocaína, álcool benzílico ou fenol; um antisséptico tal como álcool benzílico, fenol, metil- ou propil-parabeno, ou clorobutanol; um tampão tal como um sal de sódio de ácido cítrico, ácido acético ou ácido fosfórico; um agente de solubilização tal como etanol, propileno glicol ou cloridrato de arginina; um estabilizante tal como L-cisteína, L-metionina ou L-histidina; ou um aditivo tal como um agente de tonicidade.

5. Processo para preparar uma solução de galato de alquila aquosa

Galatos de alquila são difíceis de preparar em preparações farmacêuticas porque eles são altamente hidrofóbicos e moderadamente solúveis em água. A presente invenção refere-se ao processo para preparar uma solução aquosa transparente de galatos de alquila. Um galato de alquila (1 parte em peso), um tensoativo não-iônico (1 a 10 partes em peso) e água (100 a 5000 partes em peso) são misturados com um misturador ou por ultrassonicação e aquecidos a 30 a 95° C para dissolução, para fornecer uma mistura branca cremosa, que é resfriada em temperatura ambiente (aproximadamente 0 a 30° C), pelo que uma solução transparente aquosa pode ser preparada. Exemplos do tensoativo não-iônico incluem ésteres de ácido graxo de sacarose, óleo de ricino de polioxietileno / óleo de ricino endurecido, ésteres de ácido graxo de glicerina, macrogol polietileno e similares.

Exemplo 1:

Galato de octila (100 mg), éster de ácido esteárico de sacarose (Mitsubishi Chemical Foods Co., Ltd. J1816) (300 mg) e água (100 ml) são misturados com um misturador de alta velocidade e aquecidos a aproximadamente 60 a 70°C para fornecer uma mistura branca cremosa. Esta mistura é deixada descansar em temperatura ambiente, pela qual uma solução transparente aquosa é obtida.

Exemplo 2:

À água Milli-Q (aproximadamente 60 ml) aquecida a 50 a 70° C, galato de octila (100 mg) é adicionado, e a mistura é vigorosamente agitada. Após galato de octila estar completamente disperso em água, éster de ácido graxo de sacarose (geralmente 10 mg/ml, Mitsubishi Chemical Foods Co., Ltd. J1216 (D1216), J1416 (D1416), J1616 (D1616), J1816 (D1816), ou similares) (10 a 35 ml) que foi solubilizado com água Milli-Q antecipadamente é também adicionado, e em seguida agitado, pelo que uma solução aquosa transparente e incolor é obtida. Em seguida, água Milli-Q é também adicionada para formar o volume final de 100 ml.

Exemplo 3:

À água Milli-Q (100 ml) aquecida para aproximadamente 60 a 70° C, galato de propila (300 a 500 mg) é adicionado, e a mistura é vigoro-

samente agitada, pelo que uma solução aquosa transparente e incolor é obtida.

Exemplo 4:

Galato de octila (100 mg), óleo de rícino de polioxietileno endurecido (Nikko Chemicals Co., Ltd.; HCO-60) (500mg), e água (100 ml) são misturados com um misturador de alta velocidade e aquecidos para aproximadamente 60 a 70° C para fornecer uma mistura branca ligeiramente cremosa. Esta mistura é deixada descansar em temperatura ambiente, pelo que uma solução transparente aquosa é obtida.

10 Exemplo 5:

Galato de propila (500 mg), 5 mM de tampão de fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) de pH 6,5 e água Milli-Q (100 ml) a 50 a 60°C são misturados e homogeneizados com um homogeneizador de alta velocidade tal como homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem Teflon (marca registrada), pelo que uma solução aquosa transparente e incolor é obtida. A solução aquosa resultante é armazenada em um frasco de vidro marrom. Prefere-se que a luz seja sombreada durante a preparação da solução aquosa. A armazenagem é realizada em temperatura ambiente ou em um refrigerador. Quando o ar, contido na solução de galato de alquila aquosa obtida, é substituído com gás de argônio, gás He, gás N_2 ou similares, ou um antioxidante é também adicionado, a solução resultante pode ser armazenada permanentemente.

Exemplo 6:

Ao galato de octila (100 mg) e éster de ácido esteárico de sacarose (Mitsubishi Chemical Foods Co., Ltd. J1816) (100 a 300 mg), água Milli-Q (aproximadamente 50 ml) aquecida para 60 a 70°C é adicionada, e a mistura é homogeneizada com homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem Teflon (marca registrada) em uma alta velocidade, pelo que uma solução aquosa que é incolor, porém ligeiramente turva é obtida. À solução aquosa obtida, água Milli-Q é adicionada para formar o volume final de 100 ml. A armazenagem é realizada em temperatura ambiente ou em um refrigerador.

30 Exemplo 7:

Ao galato de octila (100 mg), polietileno glicol (Daiichi Kogyo Pharmaceutical Co. Ltd., macrogol #6000) (100 a 500 mg) e água Milli-Q (aproximadamente 50 ml) são adicionados, e a mistura é aquecida para 40 a 70° C e agitada para dissolver os ingredientes. Em seguida, éster de ácido esteárico de sacarose (Mitsubishi Chemical Foods Co., Ltd. J1816) (100 a 300 mg) é também adicionado, e a mistura é homogeneizada com homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem Teflon (marca registrada) em uma alta velocidade, pelo que uma solução aquosa completamente transparente é obtida. Água Milli-Q é também adicionada para formar o volume final de 100 ml. A armazenagem é realizada em temperatura ambiente ou em um refrigerador.

Exemplo 8:

À água Milli-Q (100 ml) aquecida para aproximadamente 70° C, galato de octila (10 mg) é adicionado, e a mistura é vigorosamente agitada. Após o galato de octila estar completamente disperso em água, cloridrato de arginina a 1M é também adicionado, pelo que uma solução aquosa transparente e incolor é obtida. Cloridrato de arginina pode ser um cloridrato de arginina de alquila tal como cloridrato de arginina de butiloila.

Exemplo 9: Preparação de coquetel fungicida, viricida e bactericida

Como um coquetel fungicida, viricida e bactericida, o seguinte coquetel foi preparado.

Formulação otimizada (1)

Galato de octila < 200 mg/L (este limite superior é a concentração permitida em quasifármaco pelo Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare)

Galato de propila < 2,000 mg/L (este limite superior é a concentração permitida em aditivos farmacêuticos pelo Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare)

J1816 < 2,000 mg/L

Citrato de trissódio ou citrato de hidrogênio de dissódio < 4% (p/v)

$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ < 10 mM

Polietileno glicol

Macrogol #6000 < 100 mg/L

Antioxidante tal como ácido ascórbico, ascorbato de sódio ou vitamina E < 1.000 mg/L

5 Final pH: 4 a 8

Verificou-se que quando o coquetel acima contendo macrogol #6000 foi colocado em uma escova de dentes e os dentes foram escovados com a escova de dentes, placa e tártaro puderam ser removidos.

10 Quando ar contido em uma solução aquosa do coquetel obtido no Exemplo 9 é substituído com gás de argônio, gás de He₂ ou N₂ ou similares, podem ser armazenados permanentemente.

Exemplo 10: Preparação de coquetel fungicida, viricida e bactericida

Como um coquetel fungicida, viricida e bactericida, o seguinte coquetel foi preparado:

15 Formulação otimizada (2)

Galato de octila < 200 mg/L

Galatos de propila < 2.000 mg/L

J1216 < 600 mg/L

Citrato de hidrogênio de dissódio < 4% (p/v)

20 Tampão tal como tampão de fosfato

Antioxidante (tal como ascorbato de sódio ou vitamina E)

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica de galatos de alquila que contém galatos de alquila como ingredientes ativos tendo um efeito antifúngico, antiviral ou antibacteriano, em que o grupo alquila do galato de alquila é ligado a um grupo galoíla para formar uma ligação de éster, caracterizada por compreender os seguintes dois membros de galatos de alquila:

(A) um galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é na faixa de 5 a 16; e

(B) outro galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é menor do que aquele de (A).

2. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o número de carbono do grupo alquila do galato de alquila (B) é na faixa de 2 a 7.

3. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por também conter (C) pelo menos um membro selecionado de um sal de metal de álcali, ácido bórico, borato de sódio e um sal orgânico.

4. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que é uma solução aquosa em que os galatos de alquila são solubilizados misturando-se os galatos de alquila com pelo menos um membro selecionado de um tensoativo não-iônico, polietileno glicol e arginina ou um cloridrato de um derivado destes em uma solução aquosa ou em um tampão de pH.

5. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é uma solução aquosa em que os galatos de alquila são solubilizados misturando-se 1 a 10 partes em peso de um tensoativo não-iônico e 100 a 5000 partes em peso de água com base em 1 parte em peso de galatos de alquila.

6. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que é uma solução aquosa em que os galatos de alquila são solubilizados misturando-se e aquecendo-se os galatos de alquila em uma temperatura de 30 a 95° C seguidos por

resfriamento em temperatura ambiente.

7. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que contém os galatos de alquila (A) e (B) como ingredientes ativos tendo um efeito fungicida.

5 8. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que contém os galatos de alquila (A) e (B) como ingredientes ativos tendo um efeito viricida.

9. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que contém os galatos de alquila (A) e (B) como ingredientes ativos tendo um efeito anti-influenza viral.

10 10. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que contém os galatos de alquila (A) e (B) como ingredientes ativos tendo um efeito anti-herpes viral.

11. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que contém os galatos de alquila (A) e (B) como ingredientes ativos tendo um efeito antibacteriano.

12. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que contém os galatos de alquila (A) e (B) como ingredientes ativos tendo um efeito anti-MRSA.

20 13. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que contém os galatos de alquila (A) e (B) como ingredientes ativos tendo um efeito anti-MSSA.

14. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a composição é um agente de realce da atividade de β -lactama.

25 15. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o β -lactama é oxacilina.

30 16. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 15, caracterizada pelo fato de que o galato de alquila (A) é galato de octila, e o galato de alquila (B) é galato de propila.

17. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 15, caracterizada pelo fato de que o galato de alquila (A) é galato de octila, e o galato de alquila (B) é galato de isoamila.

5 18. Composição farmacêutica de galatos de alquila de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 15, caracterizada pelo fato de que o galato de alquila (A) é galato de octila, o galato de alquila (B) é galato de propila, e (C) é citrato de hidrogênio de dissódio ou citrato de trissódio.

FIG. 1

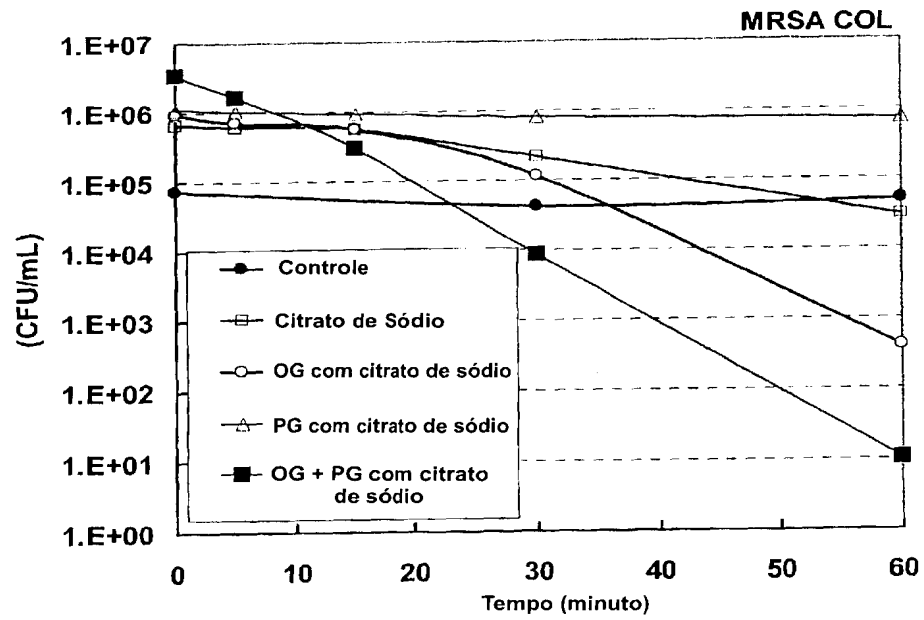


FIG. 2

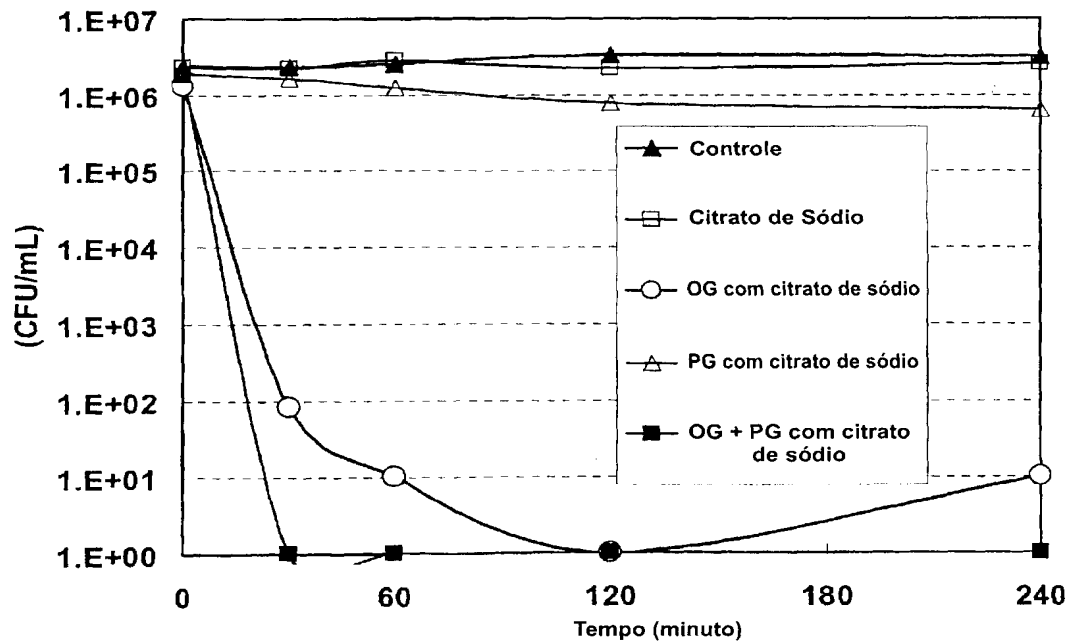


FIG. 3

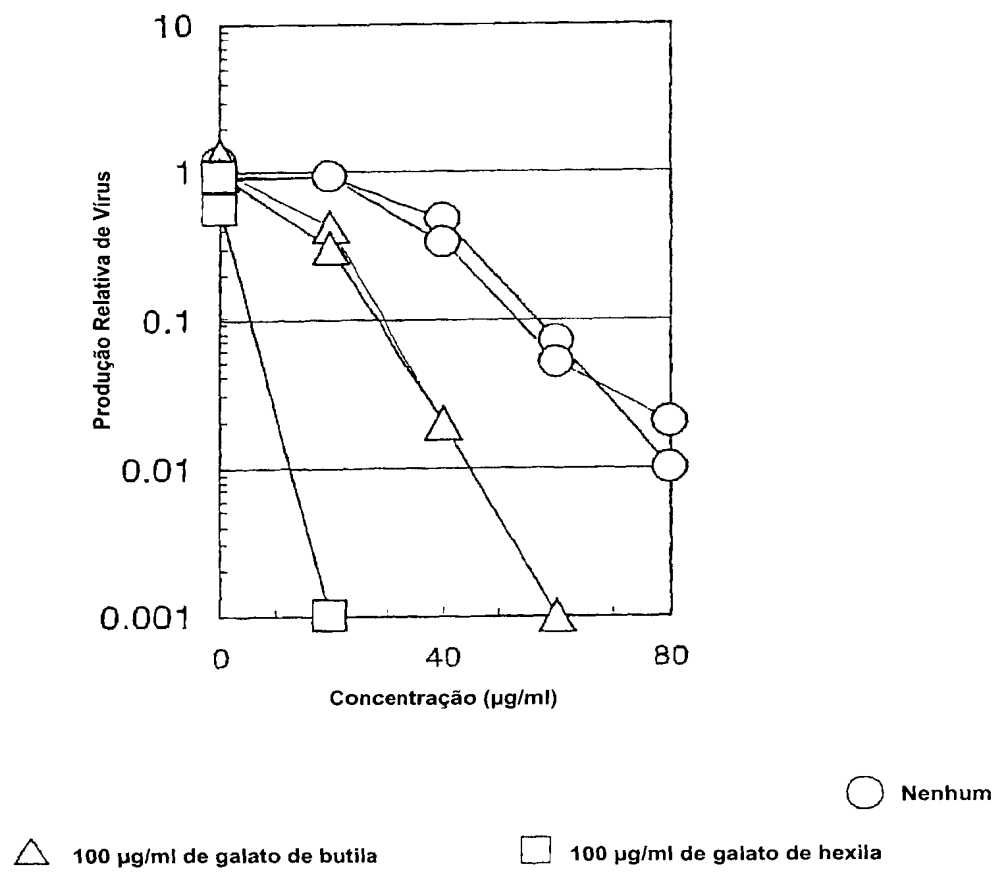
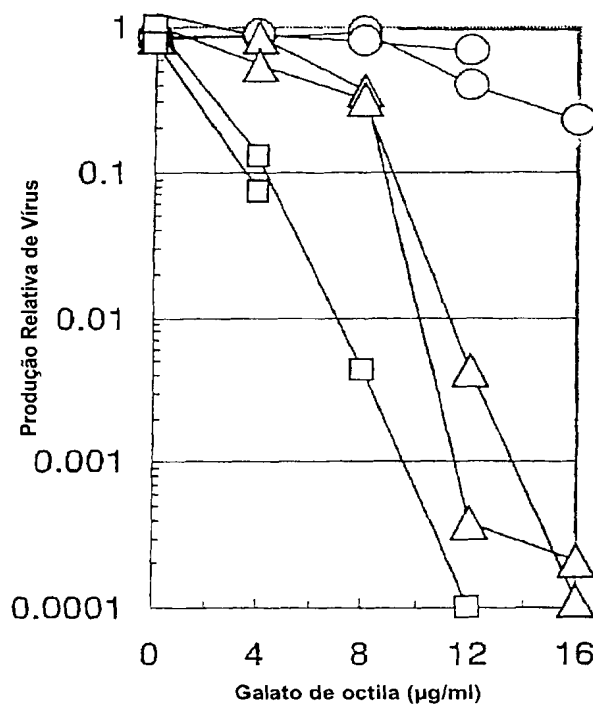


FIG. 4



○ Nenhum △ 20 µg/ml de galato de propila □ 80 µg/ml de galato de propila

FIG. 5

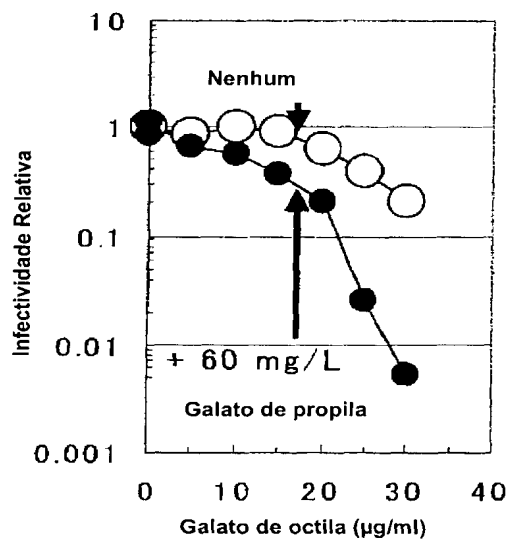


FIG. 6

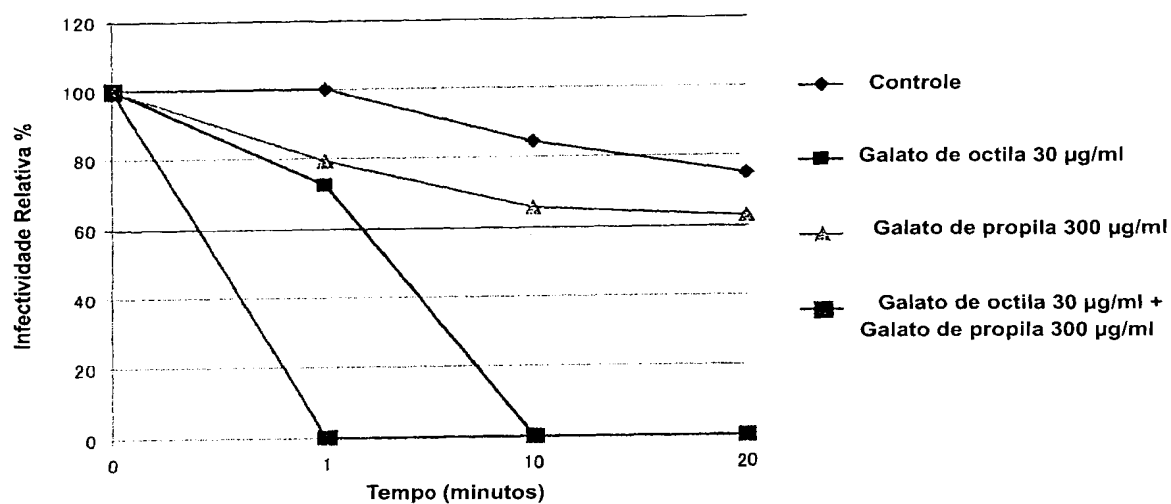


FIG. 7

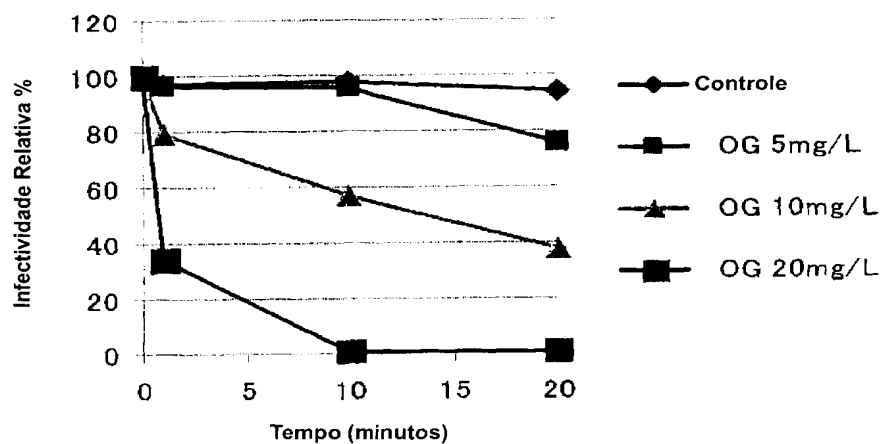


FIG. 8

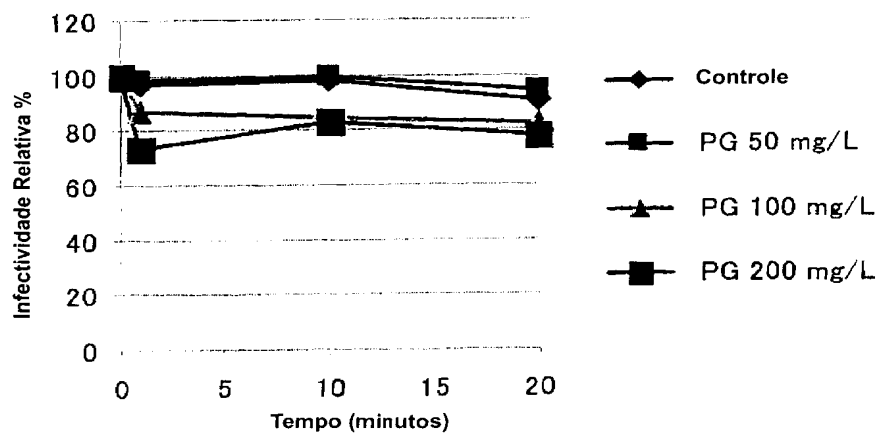


FIG. 9

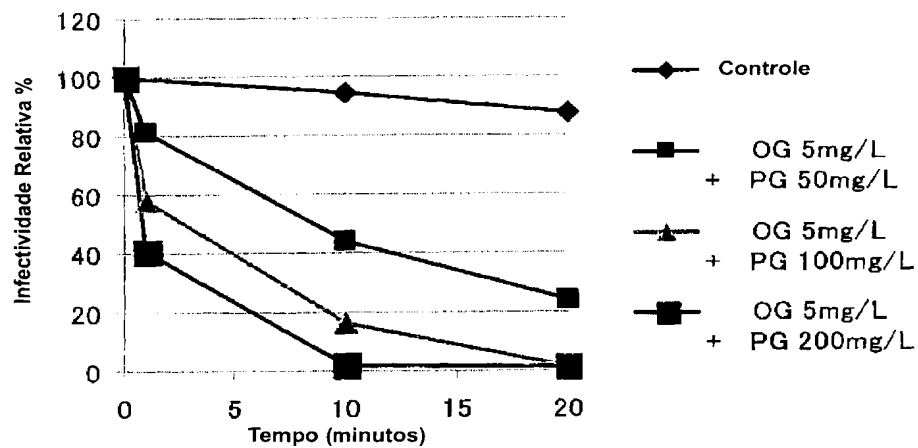


FIG. 10

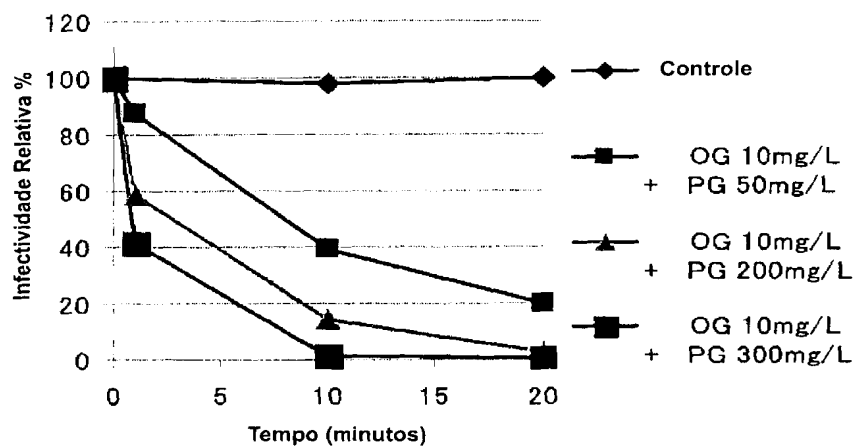


FIG. 11

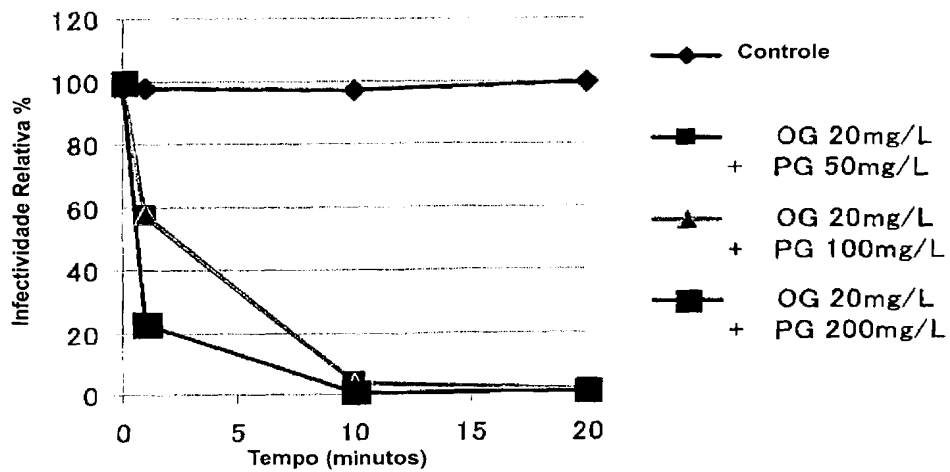
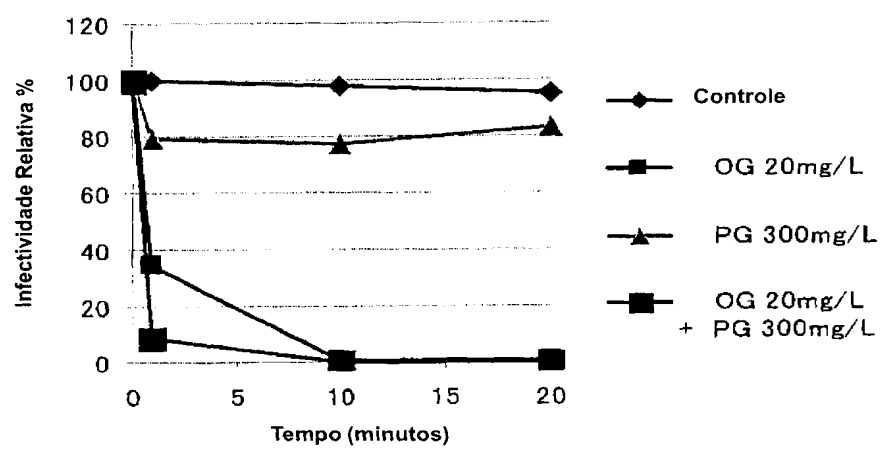


FIG. 12



RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE GALATOS DE ALQUILA**".

5 Pretende-se reforçar as atividades antifúngicas, antivirais e antibacterianas de galatos de alquila, e fornecer uma nova tecnologia e métodos que permitam a solubilização dos galatos de alquila em água.

A composição farmacêutica de galatos de alquila da presente invenção é caracterizada por conter:

10 (A) um galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é na faixa de 5 a 16 e

(B) outro galato de alquila em que o número de carbono do grupo alquila é menor do que aquele de (A).

Preferivelmente, o número de carbono do grupo alquila do galato de alquila (B) é na faixa de 2 a 7, e a composição também contém

15 (C) pelo menos um membro selecionado de um sal de metal de álcali, ácido bórico, borato de sódio e um sal orgânico.