

## **“COMPOSTOS DERIVADOS DE ALDIMINAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO”**

A presente invenção compreende compostos derivados de aldiminas, bem como composições farmacêuticas contendo tais compostos e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, além de sua utilização no tratamento de infecções fúngicas de importância médica e/ou veterinária. As aldiminas e seus derivados demonstraram apresentar uma ação antifúngica igual ou melhor que a dos medicamentos disponíveis no mercado, como o fluconazol. Por serem drogas novas, a resistência dos patógenos a elas é bastante reduzida. A síntese das aldiminas é realizada através de um processo com etapa única em que a reação se desenvolve no tempo de dois minutos e com rendimentos entre 70-98%, o que viabiliza a sua produção em larga escala, já que é um processo rápido e de baixo custo, quando comparado ao dos outros fármacos disponíveis.

A incidência de infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Em parte, isso é uma consequência de situações clínicas que levam a uma maior debilidade do sistema imune, como nos casos de tratamentos como a quimioterapia antitumoral, de transplantes e de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). As infecções fúngicas diagnosticadas mais frequentemente em humanos são causadas por patógenos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* e são uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente nos pacientes imunocomprometidos. Por sua vez, as infecções micóticas são as causas mais comuns de doenças de pele em países de regiões tropicais. Os dermatófitos, fungos filamentosos que atacam tecidos constituídos por células mortas e queratinizadas, são considerados os agentes mais frequentes desse tipo de micose. As dermatofitoses estão entre as doenças mais prevalentes no mundo, sendo a infecção fúngica superficial mais frequente no Brasil. As principais espécies envolvidas são *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. (SANTOS, D. A. *et al.* *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*: Genetic Diversity Among Species and Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Method.

- Mycopathologia*, v. 169, p. 247-255, 2010; HARRISON, T. S.; BROUWER, A. E. Systemic fungal infections. *Medicine*, v. 37, n. 12, p. 660-664, 2009; RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. i5-i11, 2005;
- 5 SILVA, C. M. *et al.* Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. *Journal Of Advanced Research*, v. 2, p. 1-8, 2011).

Vários exemplos de doenças fúngicas podem ser citados. Uma delas é a aspergilose, a qual vem se tornando uma importante causa de mortalidade entre pacientes imunossuprimidos. Nestes casos, tem sido observada a

10 resistência das espécies de *Aspergillus*, em especial *A. fumigatus*, aos agentes triazólicos, importantes fármacos atualmente utilizados no tratamento de infecções fúngicas (SINGH, N.; PATERSON, D. L. *Aspergillus* Infections in Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 1, p. 44–69, 2005; QIAO, J.; LIU, W.; LI, R. Antifungal resistance mechanisms of *Aspegillus*.

15 *Japanese Journal of Medical Mycology*, v. 49, p. 157-163, 2008; PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009).

Outro tipo de infecção fúngica é a criptococose, causada principalmente

20 pelas leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Quando o agente etiológico é *C. neoformans*, a doença atinge principalmente o sistema nervoso central. Atualmente, ela assumiu um papel relevante por ser considerada uma das micoses mais comuns em pacientes imunodeprimidos, particularmente nos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

25 (SIDA/AIDS). No Brasil, a criptococose é a maior causa de morte por micoses sistêmicas nestes pacientes. O tratamento convencional da criptococose é a terapia antifúngica prolongada, que tem se mostrado altamente tóxica e é geralmente complicada pela emergência de linhagens resistentes aos fármacos disponíveis, por exemplo, o fluconazol. Esse tratamento, portanto, tem um

30 baixo prognóstico e pode levar a sequelas neurológicas até mesmo em hospedeiros imunocompetentes (BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* species

complex. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 25, n. 1, p. S4-12, 2008; DATTA, K., BARTLETT, K. H., MARR, K. A. *Cryptococcus gattii*: emergence in western North America: exploitation of a novel ecological niche. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. v. 2009, p. 1-8, 2008; MOREIRA, T. A. *et al.* Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 3, p. 255-258, 2006; PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009; SOARES, B. M. S. *et al.* Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. 242-245, 2008; SOARES, B. M. *et al.* *Cryptococcus gattii*: *In vitro* susceptibility to photodynamic inactivation. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, p. 357–364, 2011).

As candidíases estão entre as mais frequentes infecções sanguíneas nosocomiais, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente. Contudo, nota-se a emergência de outras espécies de *Candida* como patógenos oportunistas e o aumento na frequência de infecções associadas a elas. Isso tem impacto direto no tratamento das candidíases, tendo em vista que algumas espécies, como *Candida krusei* e *Candida glabrata*, exibem resistência intrínseca a alguns agentes triazólicos, como o fluconazol e o voriconazol (GÓMEZ, J. *et al.* Candidemias nosocomiales: nuevos retos de um problema emergente. *Revista Española de Quimioterapia*, v. 23, n. 4, p. 158-168, 2010; MORACE, G., BORGHI, E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anestesiologica*, v. 76, n. 11, p. 950-956, 2010).

Além destas doenças, também pode ser citada a cromoblastomicose, uma infecção subcutânea causada por fungos dematiáceos, sendo *Fonsecaea pedrosoi* seu principal agente. Esta doença apresenta relativa frequência em alguns estados do Brasil, principalmente naqueles da região Norte. Tratar a cromoblastomicose é um desafio terapêutico, uma vez que o tratamento pode depender de diversos fatores, como o agente etiológico, o tamanho e a extensão das lesões, a tolerância individual e o estado do sistema imune do

paciente, além de estar frequentemente associado com baixas taxas de cura e altas taxas de recaída. Em virtude disso, alternativas no tratamento da cromoblastomicose são constantemente pesquisadas (ANTONELLO, V. *et al.* Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5-flucytosine association. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 52, n. 6, 5 p. 329-331, 2010; POIRRIEZ, J. *et al.* A case of chromomycosis treated by a combination of cryotherapy, shaving, oral 5-fluorocytosine, and oral amphotericin B. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 63, p. 61-63, 2000; SILVA, C. M. P. *et al.* Caracterização fenotípica e genotípica de 10 cepas de *Fonsecaea pedrosoi* isoladas de pacientes com cromoblastomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 1, n. 74, p. 41-44, 1999).

Como exemplos de dermatofitoses, citam-se *tinea pedis*, popularmente conhecida como pé de atleta, e *tinea unguium*, um tipo de onicomicose, ou seja, uma infecção fúngica que afeta as unhas dos pés e/ou das mãos. Na 15 maioria das vezes, ambas são causadas pelos mesmos patógenos, a saber, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* ou *Epidermophyton floccosum*. Essas dermatofitoses tendem à cronicidade, de modo que a terapia disponível é pouco eficaz. O potencial do fracasso terapêutico de *tinea unguium* chega a ser de 25%. Nos casos de *tinea pedis* causadas por 20 *Trichophyton rubrum*, a infecção pode persistir durante anos e as recidivas são comuns em cerca de 70% dos pacientes. Além disso, existem relatos sobre a resistência de agentes etiológicos das dermatofitoses à terbinafina. Por exemplo, nos Estados Unidos, Mukkerjee e colaboradores registraram seis isolados de *Trichophyton rubrum* resistentes a esse fármaco, tanto *in vivo* 25 quanto *in vitro*, e no Brasil, Soares e Cury registraram a mesma ocorrência para dois isolados clínicos de *Trichophyton rubrum* e seis de *Trichophyton mentagrophytes*. (LEYDEN; J. L. Tinea pedis pathophysiology and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 31, p. S3-S33, 1994; MUKKERJEE, P. K. *et al.* Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary 30 resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 82-86, 2003; ODOM, R. Pathophysiology of dermatophyte infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 28, p. S2-S7, 1993; SOARES, M. M. S.

R.; CURY, A. E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 130-134, 2001).

Existem vários fármacos disponíveis no mercado para o tratamento de

5 doenças causadas por fungos. Eles são classificados em: 1) agentes químicos clássicos, por exemplo, o iodo, os ácidos graxos e derivados, ácido salicílico, tolnaftato e tolclato, que atuam principalmente como fungistáticos de modo indireto pelo fato de modificarem as condições locais; 2) agentes químicos atuais, representados pelos imidazóis e triazóis (cetoconazol, itraconazol,

10 fluconazol, voriconazol, clotrimazol, econazol, miconazol, terconazol, butoconazol, tioconazol, oxiconazol, sulconazol e setaconazol), flucitosina e alilaminas (naftifina, terbinafina e butanafina); e 3) antibióticos, representados pelos agentes poliênicos (anfotericina B, nistatina e natamicina) e pela griseofulvina (BENNETT, J. E. Agentes antimicrobianos: agentes antifúngicos.

15 In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 11 ed., p. 1103-1118, 2006; NOBRE, M. O. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, v. 32, p. 175-184, 2002).

20 Os azóis, que abrangem as classes imidazóis e triazóis, são antimicóticos químicos de largo espectro de ação. O principal mecanismo de ação desses compostos consiste na inibição da atividade da enzima esterol 14- $\alpha$ -desmetilase (também denominada lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase), condição que leva à interrupção da biossíntese do ergosterol, uma molécula esteroide

25 importante para a manutenção da integridade e da função da membrana celular dos fungos. Como consequência, o crescimento fúngico é inibido. A metabolização dos azóis é principalmente por via hepática, sendo os efeitos colaterais mais comuns náuseas e vômitos quando utilizados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação

30 de vesículas no uso tópico. (BENNETT, J. E. Agentes antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 11 ed. Rio de Janeiro:

McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, p. 1103-1118; RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. Antifungal drugs. In: *Fungal infection – Diagnosis and management*. London: Blackwell, p. 17-43, 1993.; SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: 5 GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 799-807, 1987. *apud* NOBRE, M. O. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002).

Os compostos derivados do imidazol, de uso sistêmico ou tópico para o 10 tratamento de diversas infecções micóticas, apresentam atualmente uma grande variedade no mercado. A ação fungistática ou fungicida deste fármaco é dependente da sua concentração. Contudo, são os agentes triazólicos que têm recebido maior destaque no tratamento de infecções fúngicas, sobretudo o fluconazol e o itraconazol. Ambos apresentam largo espectro de ação e efeitos 15 tóxicos bastante reduzidos. O fluconazol praticamente não altera a síntese do ergosterol dos mamíferos, sendo menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis. Já o itraconazol concentra-se principalmente em tecidos queratinizados, especialmente na pele, podendo alcançar uma concentração cinco vezes superior neste local em relação ao nível plasmático. Mas, devido à 20 frequente utilização em pacientes com micoses superficiais e sistêmicas, tem-se observado resistência de diversas cepas fúngicas, principalmente em espécies de *Candida*. Por exemplo, foi verificada a resistência das espécies *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* principalmente em casos de indivíduos imunossuprimidos portadores de candidose. Múltiplos fatores 25 parecem contribuir para a resistência ao itraconazol, entre eles a superexpressão de bombas de efluxo da droga e a seleção de mutações no alvo do antifúngico. Além da resistência, a terapia com itraconazol apresenta outros problemas, tais como a biodisponibilidade relativamente baixa da cápsula de formulação oral, a pouca penetração no sistema nervoso central e o 30 fato de a via de administração intravenosa não ser recomendada para pacientes com disfunção renal moderada a grave, uma vez que pode haver acúmulo de um dos excipientes utilizados na solubilização, por exemplo, a

- ciclodextrina (ARENAS, R. Antimicóticos. In: *Micologia medica ilustrada*. México: Nueva editorial interamericana, p. 359-376, 1993; FAVEL, A. *et al.* Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species: a comparative study of RPMI, high resolution and casitone media; *J Mycol Med*, v. 5, p. 7-12, 1995;
- 5 VAN DEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungi resistance. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 14, n. 2, p. 44-49, 1997. *apud* NOBRE, M. O. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002; AZANZA, J. R.; GARCÍA-QUETGLAS, E.; SÁDABA, B. Farmacología de los azoles. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p.
- 10 223-22, 2007; ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Wild-Type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 Document). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 9, p. 3251–3257, 2010; FAVALESSA, O. C. *et al.* Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade *in vitro* a
- 15 drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira da Medicina Tropical*, v. 42, n. 6, p. 661-665, 2009; FERREIRA, M. E. S. *et al.* *In vitro* evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.
- 20 48, n. 11, p. 4405–4413, 2004; PFALLER, M. A. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 3, p. 747–751, 2000; PFALLER, M. A. *et al.* Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the
- 25 triazoles. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 586–590, 2011).

Por sua vez, os compostos derivados de alilamina ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ) são os mais recentes fármacos inseridos ao arsenal terapêutico antifúngico. Química e estruturalmente diferente dos demais compostos antifúngicos inibidores da biossíntese do ergosterol, sua atividade fungicida é proveniente

30 de um mecanismo de ação secundário que inibe a atividade da enzima esqualeno-epoxidase, a qual atua no passo de epoxidação do esqualeno. Como resultado, ocorre um acúmulo de esqualeno na célula fúngica, além do

bloqueio da síntese de ergosterol. A ausência desta molécula esteroidal causa modificações na estrutura da membrana das células fúngicas, acarretando na morte das mesmas. (KOKJOHN, K. *et al.* Evaluation of *in vitro* activity of ciclopirox olamine, butenafine HCl and econazole against dermatophytes and bacteria. *International Journal of Dermatology*, v. 42, p. 11-17, 2003; RYDER, N. S.; DUPONT, M.-C. Inhibition of squalene epoxidase by allylamine antimycotic compounds. *Biochemical Journal*, v. 230, p. 765-770, 1985; STÜTZ, A. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of naftifine-related allylamine antimycotics. *Journal of Medical Chemistry*, v. 29, p. 112-125, 1986).

10 Como exemplos de fármacos da classe das alilaminas, citam-se a naftifina e a terbinafina. A naftifina foi a primeira molécula a ser identificada, mostrando-se como um eficaz agente contra uma ampla variedade de fungos patogênicos. Em especial, destaca-se seu uso tópico sob a forma de creme a 1% contra as dermatofitoses *tinea cruris* e *tinea corporis*. A terbinafina, por sua vez, é uma molécula derivada da naftifina, sendo considerada atualmente como o fármaco mais efetivo contra dermatófitos. Ela pode ser administrada nas vias oral e tópica no tratamento de onicomicoses e das *tineas*, respectivamente. A terbinafina se concentra na pele e em seus anexos e por isso os dermatófitos são o maior alvo para essa droga (BENNETT, J. E. Agentes antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 11 ed., p. 1103-1118, 2006; FAVRE, B.; RYDER, N. S. Characterization of esqualene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 443-447, 1996; McCLELLAN, K. J.; WISEMAN, L. R.; MARKHAM, A. Terbinafine: an update of its use in superficial mycoses. *Drugs*, v. 58, p. 179-202, 1999; STÜTZ, A. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of naftifine-related allylamine antimycotics. *Journal of Medical Chemistry*, v. 29, p. 112-125, 1986).

Outro grupo de moléculas que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo a atividade antifúngica, são as iminas, também



conhecidas como bases de Schiff ou azometinas. A presença do grupo imina (–CH=N–) em sua estrutura pode ser responsável por gerar ou intensificar a atividade biológica dessa classe de substâncias. Em uma busca no estado da técnica, foi encontrado o pedido de patente PI0515564-9, que descreve uma

5 composição antimicrobiana em que o grupo imina não só liga grupamentos funcionais com função antibiótica e antimicrobiana, como também auxilia na intensificação ou ampliação da atividade antimicrobiana. Outros trabalhos descritos no estado da técnica utilizam bases de Schiff como ligantes na síntese de complexos metálicos. Por exemplo, os resultados dos estudos de

10 Creaven e colaboradores demonstraram que a complexação de zinco à base de Schiff derivada do quinolin-2(1H)-ona-triazol promoveu uma melhor atividade antimicrobiana e antitumoral dessas iminas (BALUJA, S.; SOLANKI, A.; KACHHADIA, N. Evaluation of Biological Activities of Some Schiff Bases and Metal Complexes. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 3, n. 4, p.

15 312-317, 2006; CREAVER, B. S. *et al.* Quinolin-2(1H)-one-triazole derived Schiff bases and their Cu(II) and Zn(II) complexes: possible new therapeutic agents. *Polyhedron*, v. 29, p. 813-822, 2010; SILVA, C. M. *et al.* Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. *Journal Of Advanced Research*, v. 2, p. 1-8, 2011).

20 Diante do exposto, apesar da variedade de fármacos disponíveis no mercado para o tratamento de infecções fúngicas, os mesmos apresentam diversas limitações. Uma delas é a resistência microbiana, haja vista o aumento na ocorrência de fungos resistentes a muitas dessas drogas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos de alto risco, devido ao uso

25 frequente e prolongado. As recidivas são outra limitação desses fármacos. Elas podem ser causadas pela própria resistência do patógeno ao medicamento, por reinfecção ou pelo fato da infecção original não ter sido erradicada em sua totalidade. O alto custo do medicamento associado ao longo período de uso pode levar o paciente a interromper antecipadamente o tratamento, sem

30 garantia de erradicação da infecção. Por fim, esses fármacos são associados a vários efeitos adversos ao paciente. (MUKKERJEE, P. K. *et al.* Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine.

*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 82-86, 2003; SOARES, M. M. S. R.; CURY, A. E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 130-134, 2001).

5            Desta forma, a busca por novos agentes antifúngicos se torna um importante alicerce no incremento do arsenal terapêutico. A presente invenção descreve o uso de derivados de aldiminas como antifúngicos em composições farmacêuticas.

10            As aldiminas compreendem uma das mais versáteis classes de substâncias orgânicas. Obtidas usualmente por meio da condensação entre aldeídos e aminas primárias, essas substâncias são caracterizadas pela presença do grupo funcional  $-C=N-$ . As aldiminas apresentam uma ampla gama de atividades biológicas descritas no estado da técnica, a saber: antimalárica, antibacteriana, antiproliferativa e antiviral. Entretanto, não há

15            relatos de aldiminas com atividade antifúngica contra fungos de importância médica e/ou veterinária. O potencial antifúngico dessas moléculas já é conhecido no estado da técnica contra fungos de interesse agrícola. Isso pode ser exemplificado com o trabalho de Singh e colaboradores, os quais sintetizaram aldiminas a partir da condensação de 2-furfurilamina com

20            benzaldeídos e avaliaram o potencial antifúngico das mesmas contra as espécies *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum capsici* e *Myrothedum roridum*. Os resultados obtidos demonstraram que grande parte das moléculas obtidas apresenta toxicidade contra os fungos testados. Já o estudo desenvolvido por Ibrahim e Al-Deeb demonstrou que as aldiminas por

25            eles sintetizadas apresentaram considerável atividade antibacteriana contra as espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (IBRAHIM, M. N.; AL-DEEB, H. K. Synthesis, Characterization and Study of the Biological activity of Some Aldimines Derivatives. *E-Journal of Chemistry*, v. 3, n. 13, p. 257-261, 2006. Disponível em: <<http://www.e-journals.net>>. Acesso em: 01 ago. 2011,

30            08:52:59. SILVA, C. M. *et al.* Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. *Journal Of Advanced Research*, v. 2, p. 1-8, 2011; SINGH, V. P.; SHARMA, J. R.; MANRAO, M. R. Synthesis of Aldimines and Effect of Nature of

Ring Attached to Azomethine Nitrogen on Biological Activity. *Journal of Indian Council of Chemists*, v. 25, n. 1, p. 7-9, 2008).

Por outro lado, a presente invenção demonstra que a ação antifúngica de derivados de aldimina contra fungos de importância médica e/ou veterinária é igual ou melhor que a de outros medicamentos disponíveis no mercado, como o fluconazol. A vantagem do uso desses compostos seria a diminuição da probabilidade dos patógenos apresentarem resistência, aumentando a chance do tratamento ter maior eficácia, comparado aos tratamentos com as drogas atualmente disponíveis. Além disso, a síntese dessas moléculas é realizada através de um processo com etapa única em que a reação se desenvolve no tempo de dois minutos e com rendimentos entre 70-98%, o que torna sua produção em larga escala um processo rápido e de baixo custo comparado ao de outros fármacos. Por exemplo, os processos de obtenção descritos para a terbinafina envolvem catalisadores metálicos que geralmente são caros ou conduzem à formação de misturas de isômeros *E* e *Z*. Assim, esses processos não são atrativos sob o ponto de vista econômico ou laboratorial, uma vez que se exige a separação desses isômeros. Uma alternativa já descrita no estado da técnica para solucionar este problema seria o uso de métodos de síntese que não exigem a presença de catalisadores metálicos. Entretanto, esses processos demandam longos períodos de reação para obtenção da terbinafina, com rendimentos de 56-92%. A síntese do fluconazol é outro exemplo que pode ser mencionado. Esta ocorre em quatro etapas e envolvendo o uso do cloreto de alumínio, um reagente altamente tóxico e de difícil manipulação. Além disso, o processo envolve reagentes relativamente caros ou de difícil manipulação. Nesse sentido, a invenção ora proposta se apresenta como vantajosa em relação ao que foi descrito no estado da técnica. (ALAMI, M.; FERRI, F.; GASLAIN, Y. A two-step synthesis of terbinafine. *Tetrahedron Letters*, v. 37, p. 57-58, 1996; DIPHARMA S.p.A. Briona Graziano Castaldi, Montevicchia Giuseppe Barreca, Pisa Renzo Rossi. *Process for the preparation of terbinafine*. US n. 6515181, 28 fev. 2002, 04 fev. 2003; KAZOKOV, P. V.; GOLOSOV, S. N. A simple method for obtaining terbinafine hydrochloride. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 38, p. 206-208,

2003; KIM, G.; SEO, M. J. A concise process of terbinafine synthesis. *Bulletin of the Korean Chemistry Society*, v. 16, p. 1002-1003, 1996).

Também foram encontrados no estado da técnica alguns documentos de patente relacionados com a presente invenção. Os mais relevantes estão listados abaixo, porém nenhum destes documentos descreve os derivados de aldiminas abordados neste pedido, bem como o seu uso como antifúngico contra espécies de importância médica e/ou veterinária.

A patente LT3956 descreve o método de produção de novos compostos cuja estrutura contém uma aldimina como um dos seus grupos substituintes, bem como sua ação fungicida. Os compostos sintetizados apresentam ação contra fungos que infectam espécies vegetais.

O documento GB1449540 descreve compostos hidróxi substituídos derivados de nitroestireno, assim como o processo para a obtenção dos mesmos. Esses compostos, obtidos a partir da reação de uma aldimina com um nitroalcano, apresentam propriedades antifúngicas, anti-helmínticas e antibacterianas, podendo estar compreendidos em composições que são administradas oralmente.

Por fim, o documento WO2004071417 descreve métodos para a identificação de moduladores de transições fenotípicas de leveduras, em especial os inibidores de transição broto-hifa de *Candida albicans*, e uso dos mesmos para tratamento de infecções fúngicas. Dentre os inibidores propostos, citam-se algumas aldiminas, porém tais moléculas são utilizadas apenas no tratamento de *Candida* e são distintas das moléculas apresentadas neste pedido de patente.

## **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A **Figura 1A** apresenta a equação química que representa a reação entre um aldeído aromático e uma amina aromática específicos para a síntese da aldimina aromática **18**.

A **Figura 1B** apresenta a equação química que representa a reação entre um aldeído e uma amina aromática específicos para a síntese da aldimina heteroaromática **38**.

A **Figura 2A** representa o espectro no infravermelho (IV) obtido para o composto **18**.

A **Figura 2B** mostra o espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) obtido para o composto **18**.

5 A **Figura 2C** representa o espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) obtido para o composto **18**.

A **Figura 3A** representa o espectro no infravermelho (IV) obtido para o composto **38**.

10 A **Figura 3B** mostra o espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ) obtido para o composto **38**.

A **Figura 3C** representa o espectro de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) obtido para o composto **38**.

15 A **Figura 4** representa as fórmulas estruturais dos compostos **2, 7, 8, 15, 16, 18, 20, 21, 29, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 43, 45, 50, 52, 54, 57, 59, 60, 63, 64, 65 e 66**.

A **Figura 5** apresenta os resultados obtidos no experimento realizado com camundongos Balb/c selvagens infectados com *Trichophyton rubrum*. Estes animais foram tratados topicamente com a aldimina **2** (gel a 10% e creme a 10%) e com itraconazol na forma de creme a 2% sete dias após a  
20 infecção. Os resultados estão expressos em unidades formadoras de colônia por grama de tecido infectado (UFC/g de tecido). O símbolo (\*) significa que o resultado é estatisticamente significativo em relação à aldimina **2** gel, aldimina **2** creme e itraconazol ( $p = 0,0004$ ). O símbolo (\*\*) é estatisticamente significativo em relação a aldimina **2** creme ( $p = 0,0043$ ) e ao itraconazol ( $p =$   
25  $0,0023$ ).

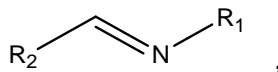
## DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

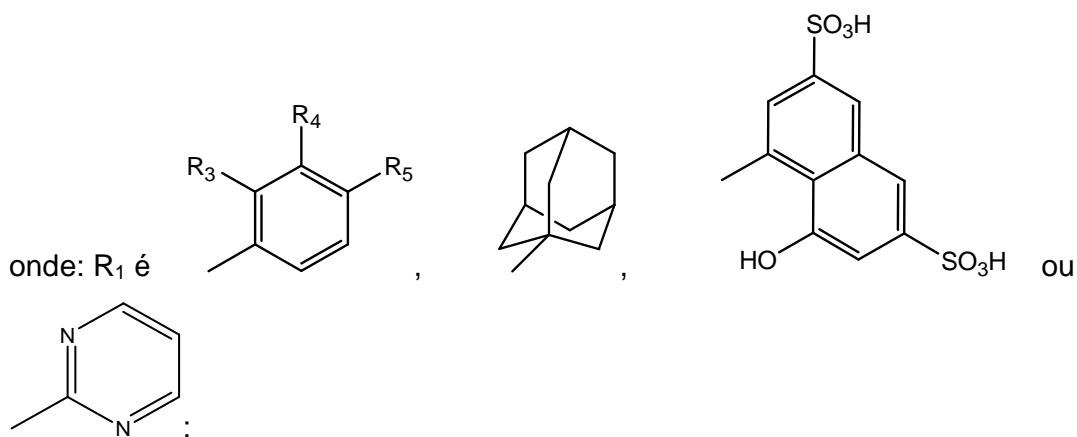
A presente invenção compreende compostos derivados de aldiminas, bem como composições farmacêuticas contendo tais compostos e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, bem como a sua utilização no tratamento de  
30 infecções fúngicas causadas por fungos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Paracoccidioides*, *Aspergillus*, *Fonsecaea*, *Trichophyton* e *Microsporum*, como *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*,

*Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus tamaris*, *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*,  
 5 *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*, não limitante a essas espécies.

De modo geral, as aldiminas foram obtidas por meio da condensação entre aldeídos e aminas aromáticas, utilizando-se etanol como solvente. Soluções etanólicas contendo quantidades equimolares dos respectivos aldeídos e aminas aromáticas foram irradiadas com micro-ondas utilizando-se  
 10 o reator DISCOVER CEM®, sob as seguintes condições: temperatura de 80 °C; potência máxima de 200 watts; tempo de rampa de 2 minutos; tempo de reação de 2 minutos; agitação máxima; e sob resfriamento. Em seguida, os produtos da reação foram purificados por recristalização, utilizando-se solventes específicos para cada produto obtido. Uma vez purificadas, as aldiminas foram  
 15 devidamente caracterizadas por espectroscopias no infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente). Os espectros na região do IV foram obtidos pela técnica de ATR em espectrofotômetro Spectro One Perkin. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) e de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) foram obtidos em espectrômetro Bruker  
 20 DPX 200 AVANCE, utilizando clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido [ $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ] como solventes deuterados. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelos sinais dos respectivos solventes. As temperaturas de fusão não corrigidas foram determinadas em aparelho MQAPF-302.

25 As aldiminas da presente invenção são representadas pelas seguintes fórmulas estruturais:

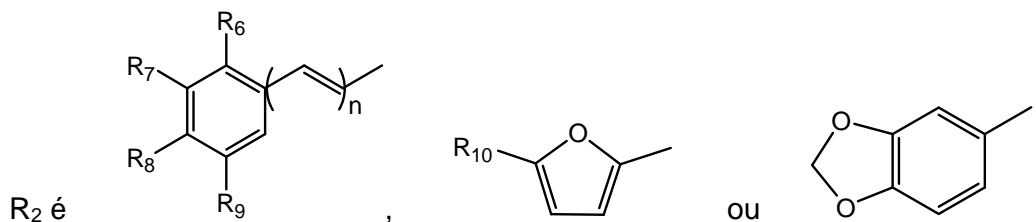




$R_3$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-OH$ ,  $-CN$  ou  $-OCH_3$ ;

$R_4$  é  $-H$  ou  $-OH$ ;

- 5  $R_5$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-OH$ ,  $-CN$ ,  $-CF_3$ ,  $-NO_2$ ,  $-SCH_3$  ou  $-OCH_3$ ;



$R_6$  é  $-H$ ,  $-OH$  ou  $-NO_2$ ;

$R_7$  é  $-H$  ou  $-OH$ ;

- 10  $R_8$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-F$ ,  $-OH$ ,  $-NO_2$  ou  $-OCH_3$ ;

$R_9$  é  $-H$  ou  $-OH$ ;

$R_{10}$  é  $-H$  ou  $-NO_2$ ; e,

$n$  é 0 ou 1.

- 15 As composições farmacêuticas da invenção caracterizam-se por apresentarem a aldimina combinada com excipientes farmacologicamente aceitáveis. As composições podem ser líquidas, sólidas ou semissólidas.

As formas líquidas podem se apresentar como solução, xarope, elixir, suspensão, emulsão, tintura ou enema. Como excipientes, podem ser

utilizados solubilizantes e tensoativos, tais como glicerina, propilenoglicol e sacarose.

Já as formas semissólidas podem se apresentar como géis, pomadas, cremes, emulsões ou pastas. Exemplos de excipientes para composições farmacêuticas semissólidas incluem metilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, polímeros derivados do ácido acrílico e metacrílico, polietilenoglicóis, vaselina sólida, parafina sólida, lanolina, óleos vegetais, óleo mineral, álcool cetílico, álcool esterílico, álcool cetosteárilico, monoestearato de glicerila, cera de ésteres cetílicos, cera autoemulsificante não iônica e aniônica, laurilsulfato de sódio, EDTA dissódico, solução conservante de parabenos, água destilada, cetilestearilsulfato de sódio, glicerina, oleato de decila e cloreto de benzalcônio

Por fim, as formas sólidas podem se apresentar como cápsulas, comprimidos, drágeas ou pastilhas. Aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, tensoativos, como celulose, lactose, amido, manitol, estearato de magnésio, talco, dióxido de silício coloidal, óxido de magnésio e caulim são exemplos de excipientes para as preparações sólidas.

Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos, por exemplo, substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química de conservantes, quelantes e estabilizantes, além de edulcorantes, corantes e aromatizantes. Exemplos dessas substâncias incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, *m*- ou *o*-cresol, formalina, álcool benzílico, parabenos, EDTA, BHA e BHT.

Essas composições podem ser administradas pelas vias intramuscular, intravenosa, subcutânea, tópica, oral, inalatória ou por dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

Para uma melhor compreensão da tecnologia, seguem exemplos os quais não são limitantes da mesma.

### 30 **Exemplo 1: Obtenção e caracterização da aldimina 18**

O composto **18** foi obtido por meio da condensação entre o aldeído aromático e a amina aromática, conforme representado na **Figura 1A**. O



produto da reação foi purificado por recristalização, utilizando-se etanol como solvente.

No espectro obtido na região do IV (**Figura 2A**), verifica-se a presença da banda de absorção em  $1609\text{ cm}^{-1}$ , característica do estiramento da ligação C=N. Bandas provenientes dos estiramentos das ligações C=C dos anéis aromáticos também são verificadas em 1592, 1548, 1511 e  $1460\text{ cm}^{-1}$ . Adicionalmente, as bandas de absorção características dos estiramentos das ligações O-H são verificadas em  $3050\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 2B**), verifica-se a presença de um sinal bastante característico, que se apresenta como um simpleto agudo em  $\delta$  8,78, referente ao hidrogênio do grupamento CH=N. Embora a presença de substituintes doadores e/ou retiradores de elétrons nos anéis aromáticos possa exercer certa influência no deslocamento químico desse sinal, esse efeito não é tão pronunciado para os compostos sintetizados. Em geral, os sinais referentes aos hidrogênios fenólicos apresentaram uma maior variação de deslocamento químico. Para o composto **18**, esses sinais são observados em  $\delta$  8,35, 9,55, 9,79 e 14,66 ppm. Com relação aos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, verifica-se uma grande variação de multiplicidade e deslocamento químico, de acordo com os substituintes presentes nas moléculas e suas posições relativas. Em geral, compostos *para*-substituídos apresentam espectros relativamente mais simples devido à grande simetria. Para estes, observa-se a presença de um par de dupletos com integrais correspondentes a dois hidrogênios cada. No espectro da aldimina **18**, os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos se apresentam como um duplete em  $\delta$  6,32 ppm, um multiplete em  $\delta$  6,79-7,15 ppm e outro duplete em  $\delta$  7,41 ppm.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 2C**), o sinal correspondente ao carbono do grupamento CH=N se apresenta como um dos mais desprotegidos, em  $\delta$  159,3 ppm. Esse valor pode variar entre  $\delta$  154,6 e 164,1 ppm, de acordo com os substituintes presentes na molécula. Embora esse sinal seja observado na mesma região que os sinais referentes aos carbonos diretamente ligados a grupamentos hidroxila, sua atribuição pode ser feita de forma precisa com

auxílio do subespectro DEPT 135. Os sinais referentes aos carbonos aromáticos são verificados em  $\delta$  108,1; 112,2; 116,6; 118,6; 120,1; 124,1; 127,4; 133,0; 133,3; 149,8; 150,3 e 157,3 ppm.

### Exemplo 2: Obtenção e caracterização da aldimina **38**

5 O composto **38** foi obtido por meio da condensação entre o aldeído aromático e a amina aromática, conforme representado na **Figura 1B**. O produto da reação foi purificado por recristalização, utilizando-se etanol como solvente.

No espectro obtido na região do IV (**Figura 3A**), verifica-se a presença da banda de absorção característica do estiramento da ligação C=N, em 1620  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas provenientes dos estiramentos das ligações C=C dos anéis aromáticos também são verificadas em 1586, 1567, 1519, 1468, 1442 e 1399  $\text{cm}^{-1}$ . Adicionalmente, duas bandas de absorção características dos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo  $-\text{NO}_2$  são observadas em 1494 e 1341  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Verifica-se, também, uma banda de absorção aguda e intensa em 2228  $\text{cm}^{-1}$ , proveniente do estiramento da ligação C $\equiv$ N.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 3B**), verifica-se a presença de um sinal bastante característico, que se apresenta como um simpleto agudo em  $\delta$  8,66 ppm, referente ao hidrogênio do grupamento CH=N. Embora a presença de substituintes doadores e/ou retiradores de elétrons nos anéis aromáticos possa exercer certa influência no deslocamento químico desse sinal, esse efeito não é tão pronunciado para os compostos sintetizados. Com relação aos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, verifica-se uma grande variação de multiplicidade e deslocamento químico, de acordo com os substituintes presentes nas moléculas e suas posições relativas. No espectro do referido composto observam-se dois conjuntos de sinais em  $\delta$  7,37-7,52 e  $\delta$  7,67-7,89 ppm, correspondendo aos seis hidrogênios aromáticos. Apesar dessa região se apresentar bastante congestionada, é possível observar a presença de um duplete centrado em  $\delta$  7,79 ppm, com constante de acoplamento escalar igual a 3,9 Hz, oriundo do átomo de hidrogênio vizinho ao grupamento  $-\text{NO}_2$ , pertencente ao anel furânico. Embora esse sinal se apresente numa mesma

região que aqueles observados para os hidrogênios do anel aromático derivado do benzeno, a diferença observada entre as constantes de acoplamento escalar possibilita uma atribuição inequívoca do mesmo.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 3C**), o sinal correspondente ao carbono do grupamento  $\text{CH}=\text{N}$  é visualizado numa região mais blindada quando comparada ao composto **18**, em  $\delta$  151,5 ppm. O sinal referente ao carbono do grupamento  $\text{C}\equiv\text{N}$  é verificado em  $\delta$  117,0 ppm. Os sinais referentes aos carbonos aromáticos são observados em  $\delta$  107,4; 113,9; 119,1; 119,9; 127,6; 133,5; 134,5; 151,7; 152,4 e 152,8 ppm.

### 10 **Exemplo 3: Testes de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de aldiminas para fungos dermatófitos**

Os testes de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antifúngicos constituem a primeira evidência experimental do potencial de uma determinada substância. O método utilizado para a determinação da atividade antifúngica contra dermatófitos baseia-se na observação da inibição do crescimento ou indução da morte de conídios fúngicos submetidos a diferentes concentrações da droga em comparação com controles não tratados (SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 98-101, 2006).

Foram selecionados seis isolados clínicos de dermatófitos das espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Micologia do ICB/UFMG. Todas as amostras foram mantidas em Ágar Sabouraud Dextrose 2% e em solução salina esterilizada a 4°C.

Para o inóculo fúngico, pequenos fragmentos das colônias estocadas em solução salina foram cultivados em tubos contendo ágar batata dextrose inclinado e incubados a 28°C durante 7 dias. A massa de micélio obtida foi coberta com 4,0 mL de salina estéril 0,90%, e assepticamente submetida à uma raspagem da superfície do ágar com alça de platina. A mistura resultante

de conídios e fragmentos de hifas foi filtrada em filtros Whatman número 40 (poros de 8  $\mu\text{m}$ ), de forma que o filtrado continha apenas microconidiosporos dos fungos. A densidade óptica da suspensão foi lida em espectrofotômetro e ajustada para uma densidade óptica de 0,09 a 0,11, equivalente a 70-72% de transmitância no comprimento de onda de 520 nm, o que proporcionou uma concentração de  $10^6$  células/mL. Estas suspensões foram diluídas na proporção de 1:50 em meio RPMI-1640 para os testes, obtendo-se uma concentração final de  $10^4$  UFC/mL.

Todos os fungos foram testados frente a cinco diferentes aldiminas (**41**, **43**, **50** e **52**), as quais foram solubilizadas em DMSO em concentração inicial de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A partir desta solução, preparou-se uma solução em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS, a qual foi diluída em série para a realização dos testes. A faixa testada foi de 0,5 a 256  $\mu\text{g/mL}$ .

Uma vez realizada a diluição seriada das drogas, foram transferidos volumes de 0,1 mL de cada diluição para poços em uma placa de microdiluição de 96 poços, de fundo chato e a estes foi acrescentado 0,1 mL da suspensão de cada uma das amostras de dermatófitos. As placas foram incubadas a 28°C durante sete dias. Foram utilizados poços sem as drogas e com o microrganismo como controle não tratado, bem como aqueles contendo apenas o meio de cultura e a droga (controle de esterilidade). Todas as concentrações foram testadas em duplicata. A leitura dos resultados foi baseada em escala de crescimento e aferida de modo visual, de modo que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração que inibiu 100% do crescimento fúngico em comparação com o controle não tratado.

A **Tabela 1** apresenta os valores de CIM de para as quatro aldiminas testadas frente a todas as amostras de dermatófitos. As fórmulas estruturais das aldiminas testadas estão representadas na **Figura 4**.

**Tabela 1:** Dados referentes à avaliação da atividade *in vitro* de quatro aldiminas contra espécies de *Trichophyton*. CIM: Concentração inibitória mínima (em µg/mL); Cl: isolado clínico; Itraconazol: antifúngico utilizado comercialmente no tratamento de infecções fúngicas, usado como controle positivo do teste.

Espécies	Aldiminas				Itraconazol*
	41	43	50	52	
	CIM (µg/mL)				
<i>Trichophyton interdigitale</i>	16	256	16	64	0,25
<i>Trichophyton gypseum</i>	8	256	16	128	0,25
<i>Trichophyton canis</i>	8	256	8	64	ND
<i>Trichophyton rubrum</i>	16	128	16	64	0,25
<b>TM 865</b>	32	128	8	64	ND
<b>TM 312</b>	16	256	16	128	ND

\* Itraconazol foi utilizado como controle positivo;

\*\*CIM: Concentração Inibitória Mínima para 100% do crescimento visual do fungo.

ND = Não determinado

Observa-se que as aldiminas promoveram inibição do crescimento fúngico em concentrações  $\leq 256$  µg/mL. Particular atenção deve ser destinada as aldiminas **41** e **50** que apresentaram CIM  $\leq 32$  µg/mL para todas as amostras testadas. Os resultados são interessantes, pois demonstram boa atividade antifúngica contra os dermatófitos testados.

#### **Exemplo 4: Testes de determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de aldiminas para fungos sistêmicos**

A atividade de diversas aldiminas foi testada frente aos seguintes fungos de importância médica: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *A. tamarii*, *A. flavus*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* e *Fonsecaea pedrosoi*.

Para a avaliação da sensibilidade das amostras fúngicas às aldiminas, o teste de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado segundo o método de microdiluição em caldo proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram preparadas soluções estoque desses compostos, os quais foram dissolvidos em DMSO e diluídos em RPMI 1640 até a

concentração de 1000 µg/ml. A partir dessa solução, foram feitas dez diluições seriadas usando como diluente o próprio RPMI 1640. As diluições foram preparadas de modo que concentrações de teste das aldiminas variaram de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml. Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram distribuídas nos poços de uma placa de microdiluição de 96 poços (Clinical and Laboratory Standards Institution. *CLSI Document M38-A2*: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard – Second Edition. Wayne, USA, v. 28, n. 16, 2008; Clinical and Laboratory Standards Institution. *CLSI Document M27-A3*: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – Third Edition. Wayne, USA, v. 28, n. 14, 2008.)

Para o preparo do inóculo das leveduras (*Candida ssp.* e *Cryptococcus ssp.*), as amostras fúngicas foram cultivadas em meio Agar Sabouraud dextrose (ASD) inclinado e incubadas a 35°C por 48h. No caso dos fungos filamentosos (*Aspergillus ssp.*), os inóculos foram preparados a partir de amostras fúngicas cultivadas em meio Agar batata inclinado e incubadas a 28°C por 7 dias. Foram preparadas suspensões padronizadas dos fungos. As culturas de leveduras foram removidas separadamente com uma alça estéril e foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada. As suspensões obtidas foram homogeneizadas em vórtex e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm, ajustando-se a transmitância de 75 a 77%, correspondente à concentração de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Estas suspensões de levedura foram homogeneizadas durante 15 segundos em vórtex e diluídas duas vezes com o meio RPMI 1640, a primeira na proporção de 1:50 e a segunda na proporção de 1:20, de modo que o inóculo apresentava concentração final de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL. Já as colônias de fungos filamentosos foram inicialmente lavadas com solução salina e Tween 20 (1%) e transferidas para outro tubo de ensaio vazio esterilizado. Após a decantação por 3 a 5 minutos dos fragmentos de hifas, o sobrenadante contendo os esporos foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada. Essa suspensão foi homogeneizada em vórtex e lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm, ajustando-se a

transmitância de 80 a 82%, a qual corresponde à concentração de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL. As suspensões de fungos filamentosos foram homogeneizadas durante 15 segundos em vórtex e diluída com meio RPMI na proporção de 1:50.

- 5 Em cada placa foram realizados os seguintes controles: (1) não tratado, contendo apenas RPMI 1640 e inóculo, (2) esterilidade, contendo apenas o meio RPMI 1640, e (3) toxicidade, contendo inóculo, RPMI 1640 e DMSO na maior concentração utilizada no teste. Além disso, a concentração inibitória mínima do fluconazol também foi determinada e utilizada para comparação
- 10 com os resultados obtidos para as aldiminas. Aos poços contendo 100µL das soluções de aldiminas (1000 µg/mL em DMSO), foram acrescentados 100µL dos inóculos fúngicos, de modo que a concentração final destes variasse de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL para leveduras e de 0,4 a  $5 \times 10^4$  UFC/mL para fungos filamentosos. As placas foram incubadas em tempo e temperatura específicos
- 15 para cada fungo, de acordo com a **Tabela 2**. A leitura do teste foi realizada visualmente, sendo a CIM definida como a menor concentração da aldimina capaz de inibir o crescimento microbiano após a incubação.

**Tabela 2:** Tempo e temperatura de incubação utilizados nos testes para determinação de CIM para os fungos dos gêneros *Candida*., *Cryptococcus*,  
20 *Aspergillus*, *Fonsecaea* e *Paracoccidioides*.

Gênero fúngico	Tempo de incubação	Temperatura de incubação
<i>Candida</i>	48 horas	37°C
<i>Cryptococcus</i>	72 horas	35°C
<i>Aspergillus</i>	48 horas	28°C
<i>Fonsecaea</i>	7 dias	28°C
<i>Paracoccidioides</i>	10 dias	37°C

A **Tabela 3** mostra os resultados de CIM das aldiminas testadas contra espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Paracoccidioides brasiliensis*. As fórmulas estruturais dessas aldiminas estão representados na **Figura 4**. Observa-se que todos os compostos promoveram inibição do

25 crescimento fúngico das diferentes espécies fúngicas testadas, mas *Aspergillus*

*clavatus* e *Fonsecaea pedrosoi* foram as mais sensíveis a todos os compostos testados. O composto **15** destaca-se por seu maior espectro de atividade. Já a **Tabela 4** mostra os resultados de CIM dos mesmos compostos contra os isolados de *Cryptococcus* spp. Todos estes foram sensíveis aos compostos testados, sendo seus valores de CIM algumas vezes menores aqueles referentes ao fluconazol.

As CIMs variaram tanto em função da aldimina quanto da espécie fúngica testada. O composto **15** (**Figura 4**) apresentou CIM de 32 µg/mL para *C. krusei*, o mesmo resultado obtido para o fluconazol. Esse resultado merece destaque, uma vez que esta espécie é intrinsecamente resistente ao fluconazol e tem emergido como importante causa de infecção em pacientes que receberam transplantes de medula óssea e neutropênicos (WINGARD, J.R. *et al.* Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *The New England Journal of Medicine*, v. 325, n. 18, p. 1274-1277, 1991; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida krusei* infections and fluconazole therapy. *Hong Kong Medical Journal*, v. 3, n. 3, p.312-314, 1997).

Com relação às espécies de *Aspergillus*, a espécie mais sensível às aldiminas testadas foi *A. clavatus*. Os compostos **18**, **29**, **34** e **36** (**Figura 4**) apresentaram o mesmo valor de CIM que o fluconazol (64 µg/mL) para essa espécie. As aldiminas **15**, **16**, **20**, **38** e **50** (**Figura 4**) foram duas vezes mais potentes que o fluconazol em inibir o crescimento de *A. clavatus*. Os compostos **2**, **7** e **8** (**Figura 4**) apresentaram CIM de 16 µg/mL, enquanto a aldimina **31** (**Figura 4**) foi oito vezes mais potente que o fluconazol na inibição de *A. clavatus*. Contudo, o composto **41** inibiu o crescimento de *A. clavatus* em uma concentração 16 vezes mais potente que o fluconazol. O mesmo valor de CIM do fluconazol foi obtido ao se testar as aldiminas **2** e **15** (**Figura 4**) contra *A. tamarii* e **15**, **36** e **38** (**Figura 4**) contra *A. flavus*. Contra *A. niger*, as aldiminas **7**, **16**, **31** e **36** (**Figura 4**) foram tão potentes quanto o fluconazol, enquanto a aldimina **15** (**Figura 4**) foi duas vezes mais potente que esse antifúngico, com uma CIM de 32 µg/mL. Já para a espécie *A. fumigatus* as aldiminas **7**, **31** e **34** (**Figura 4**) apresentaram a mesma CIM do fluconazol. As



aldiminas **2**, **20**, **29** e **36** (**Figura 4**) apresentaram CIM de 32 µg/mL. As aldiminas **16** e **38** (**Figura 4**) inibiram o crescimento de *A. fumigatus* em concentrações quatro vezes menores que as do fluconazol.

*Fonsecaea pedrosoi*, agente da cromoblastomicose, apresentou CIM para o fluconazol de 16 µg/mL, mesmo valor apresentado pelas aldiminas **7**, **16**, **31**, **34** e **38** (**Figura 4**). A CIM para os compostos **15**, **18** e **41** (**Figura 4**) foi duas vezes menor que para o fluconazol, enquanto que as aldiminas **20** e **29** (**Figura 4**) foram quatro vezes mais potentes que o fluconazol em inibir o crescimento de *F. pedrosoi*. Uma vez que os agentes etiológicos da cromoblastomicose podem apresentar resistência a diversos antifúngicos, incluindo o fluconazol, é ideal que se encontrem compostos mais eficazes para o tratamento dessa doença. (VIVAS, J.R.C.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M. Sensibilidad de hongos miceliares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 18, p. 113-117, 2001; ESTERRE, E.; QUEIROZ-TELLES, F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 19, p. 148–152, 2006).

O agente da paracoccidioidomicose se mostrou sensível ao tratamento com diversas aldiminas, sendo tão sensível ao fluconazol quanto às aldiminas **20**, **29**, **34**, **36** e **38** (CIM de 4 µg/mL) (**Figura 4**). Além dessas, outras aldiminas apresentaram bons resultados contra *Paracoccidioides brasiliensis*. A CIM para a aldimina **33** (**Figura 4**) foi de 16 µg/mL, enquanto que para a aldimina **36** (**Figura 4**) o valor foi de 32 µg/mL. A descoberta de compostos com atividade contra *Paracoccidioides* spp. é de particular importância, uma vez que essa é a micose profunda mais prevalente na América Latina e aproximadamente 80% dos pacientes diagnosticados com a paracoccidioidomicose são do Brasil. (TABORDA, C.P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*, v. 165, p. 331–339, 2008; PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009).

*C. neoformans* e *C. gattii* também se mostraram sensíveis a diversas aldiminas. Para *C. gattii*, os compostos **2**, **7**, **8**, **15** e **16** (**Figura 4**) apresentaram valores de CIM entre 9,0 µg/mL e 5,2 µg/mL, os quais são quase duas vezes menores que o do fluconazol (9,54 µg/mL). As aldiminas **41** e **50** apresentaram valores de CIM de 2,3 µg/mL e 3,8 µg/mL, respectivamente, sendo mais potentes que o antifúngico utilizado como controle. Outras aldiminas (por exemplo, **18**, **20**, **29**, **31** e **34**, representadas na **Figura 4**) apresentaram valores de CIM próximos aos do fluconazol. Já para *C. neoformans*, os compostos **2**, **7**, **8**, **15**, **29**, **41** e **50** (**Figura 4**) apresentaram valores de CIM menores que os do fluconazol, cuja CIM foi de 5,8 µg/mL. Valores próximos a este foram obtidos para as aldiminas **7**, **16**, **18**, **20**, **29**, **31**, **34**, **36** e **38** (**Figura 4**). Esses resultados merecem destaque, uma vez que a criptococose é a maior causa de morte por micoses sistêmicas em pacientes com AIDS no Brasil. Além disso, *C. gattii* vem sendo considerado um patógeno primário humano emergente, podendo apresentar resistência ao fluconazol (DATTA, K., BARTLETT, K.H., MARR, K.A. *Cryptococcus gattii*: emergence in western North America: exploitation of a novel ecological niche. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2009, 2009 ; PRADO, M. *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009; SOARES, B.M.S. *et al.* Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. 242-245, 2008).

**Tabela 3:** Avaliação da atividade *in vitro* de doze aldiminas derivadas do 2-aminofenol contra espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Paracoccidioides brasiliensis*. CIM: Concentração inibitória mínima (em µg/mL); CI: isolado clínico; Fluconazol: antifúngico utilizado comercialmente no tratamento de infecções fúngicas, usado como controle positivo do teste.

Especies		Aldiminas																		Fluconazol <sup>b</sup>
		2	20	21	7	8	15	16	18	38	33	34	35	36	37	29	31	41	50	
CIM** (µg/mL)																				
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	128	>128	>128	64	>128	32	128	128	32	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	128	32	2	
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	256	>128	>128	64	128	64	128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128	2	
<i>C. krusei</i> ATCC20298	128	>128	>128	64	>128	32	128	128	64	64	>128	>128	64	128	128	128	128	>128	32	
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 20019	256	>128	>128	128	>128	16	128	128	64	128	128	>128	>128	>128	>128	64	128	64	1	
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	128	64	>128	64	128	16	64	128	16	32	>128	>128	32	>128	128	64	128	64	1	
<i>C. dubliniensis</i> Cd 28 CI***	128	128	>128	64	128	32	64	64	64	>128	>128	>128	>128	>128	128	64	128	128	0.125	
<i>A. spiegelii</i> fumigatus ATCC16913	32	>128	>128	64	128	16	128	128	16	64	64	128	32	128	>128	64	128	32	64	
<i>A. flavus</i> IMI 190443	>128	>128	>128	128	>128	64	>128	128	64	128	>128	>128	64	>128	>128	128	>128	>128	>64	
<i>A. clavatus</i> CI***	16	32	>128	16	16	32	32	64	32	64	64	128	64	128	64	8	4	32	64	
<i>A. tamarii</i> CI***	64	>128	ND	128	>128	64	>128	>128	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>128	128	128	>128	>64	
<i>A. fumigatus</i> CI***	64	>128	ND	>128	128	16	128	>128	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>128	64	128	128	>64	
<i>A. niger</i> CI***	64	128	>128	64	128	32	64	128	32	64	128	128	64	128	128	64	128	128	>64	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 46428	8	4	64	32	16	8	16	8	16	64	16	>128	ND	>128	4	16	8	32	16	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> B339	ND	4	32	ND	ND	ND	ND	ND	4	16	4	32	4	32	4	ND	ND	ND	2	

\* Fluconazol foi utilizado como controle positivo;

\*\*CIM: Concentração Inibitória Mínima para inibir 100% do crescimento visual do fungo;

\*\*\*CI: Isolado Clínico.

ND - não determinado

**Tabela 4:** Dados referentes à avaliação da atividade *in vitro* de nove aldiminas derivadas do 2-aminofenol contra 12 linhagens de *Cryptococcus neoformans* e 12 linhagens de *Cryptococcus gattii*. CIM: Concentração inibitória mínima; CIM 50: concentração inibitória mínima para 50% dos isolados testados; CIM 90: concentração inibitória mínima para 90% dos isolados testados; Fluconazol: antifúngico utilizado comercialmente no tratamento de infecções fúngicas, usado como controle positivo do teste.

	Linhagens	Aldiminas											Fluconazol*
		2	20	7	8	15	16	18	31	29	41	50	
Cryptococcus neoformans		CIM (µg/mL)											
	ATCC 24067	5.7	4.0	5.7	2.8	4.0	8.0	11.3	8.0	4.0	2.8	1.4	5.7
	ATCC 28957	8.0	5.7	4.0	2.8	4.0	8.0	16.0	5.7	4.0	2.0	1.4	1.4
	ATCC 62066	2.0	2.8	2.0	1.4	2.0	2.8	5.7	2.8	1.4	1.4	1.0	8.0
	F10	5.7	11.3	4.0	8.0	4.0	11.3	16.0	11.3	8.0	2.0	1.4	4.0
	Lmm 820	5.7	4.0	4.0	2.8	4.0	5.7	11.3	16.0	4.0	2.8	2.0	8.0
	VM	5.7	5.7	5.7	4.0	4.0	8.0	11.3	32.0	8.0	4.0	2.8	8.0
	C31	2.0	4.0	4.0	2.8	2.8	5.7	8.0	8.0	4.0	1.4	2.0	2.0
	Wp	8.0	5.7	5.7	4.0	2.8	8.0	11.3	11.3	8.0	2.8	1.4	8.0
	5396	5.7	5.7	5.7	5.7	4.0	11.3	16.0	22.6	8.0	1.4	2.0	5.7
	96806	4.0	5.7	8.0	4.0	4.0	11.3	11.3	11.3	5.7	1.4	2.0	45.3
	27JF	5.7	11.3	11.3	4.0	5.7	11.3	16.0	32.0	16.0	2.8	2.8	4.0
	28JF	8.0	11.3	11.3	5.7	4.0	11.3	8.0	11.3	11.3	2.8	2.8	5.7
	média geométrica	5.0	5.8	5.3	3.7	3.7	8.0	11.3	11.6	5.8	2.2	1.8	5.8
	CIM 50**	5.7	5.7	5.7	4.0	4.0	8.0	11.3	11.3	5.7	2.0	2.0	5.7
	CIM 90**	8.0	11.3	11.3	5.7	4.0	11.3	16.0	32.0	11.3	2.8	2.8	8.0
	faixa	2,0-8,0	2,8-11,3	2,0-11,3	1,4-8,0	2,0-4,0	2,8-11,3	5,7-16,0	2,8-32	1,4-16,0	1,4-4,0	1,0-2,8	1,4-45,3
Cryptococcus gattii													
	ATCC 24065	8.0	8.0	4.0	5.7	4.0	8.0	11.3	8.0	5.7	2.0	1.4	4.0
	ATCC 32608	16.0	16.0	5.7	8.0	5.7	8.0	11.3	16.0	22.6	2.8	4.0	16.0
	L135/03	8.0	11.3	11.3	8.0	5.7	8.0	11.3	16.0	16.0	4.0	11.3	8.0
	L28/02	8.0	11.3	5.7	5.7	4.0	8.0	8.0	16.0	16.0	2.0	4.0	11.3
	23/10993	5.7	4.0	11.3	4.0	4.0	11.3	11.3	8.0	5.7	1.4	2.8	4.0
	196L/03	8.0	8.0	11.3	8.0	5.7	8.0	22.6	16.0	4.0	2.8	2.8	16.0
	1913	8.0	11.3	11.3	8.0	11.3	8.0	16.0	16.0	8.0	2.8	2.8	8.0
	547	11.3	16.0	11.3	8.0	5.7	8.0	22.6	16.0	11.3	4.0	4.0	16.0
	L27	32.0	45.3	16.0	16.0	11.3	11.3	16.0	64.0	64.0	5.7	11.3	32.0
	818	5.7	11.3	8.0	5.7	4.0	8.0	8.0	8.0	5.7	1.0	2.0	11.3
	L24/01	5.7	8.0	5.7	5.7	2.8	8.0	8.0	16.0	8.0	2.0	8.0	8.0
	29/10893	8.0	8.0	8.0	4.0	4.0	8.0	8.0	16.0	8.0	1.0	2.0	4.0
	média geométrica	9.0	11.0	8.5	6.7	5.2	8.5	12.0	15.1	10.4	2.3	3.8	9.5
	CIM 50**	8.0	11.3	8.0	5.7	4.0	8.0	11.3	16.0	8.0	2.0	2.8	8.0
	CIM 90**	16.0	16.0	11.3	8.0	11.3	11.3	22.6	16.0	22.6	4.0	11.3	16.0
	faixa	5,7-32,0	4,0-45,3	4,0-16,0	5,7-16,0	2,8-11,3	8,0-11,3	8,0-22,6	8,0-64,0	4,0-64,0	1,0-5,7	1,4-11,3	4,0-32,0

\* Fluconazol foi utilizado como controle positivo;

\*\*CIM: Concentração Inibitória Mínima para inibir 50% (CIM50) ou 90% (CIM90) do crescimento visual do fungo;

De uma maneira geral, as aldiminas **15, 20, 29, 34, 36, 38, 41 e 50** foram as que apresentaram maior espectro de ação contra as linhagens fúngicas testadas.

#### Exemplo 5: Testes de determinação de Concentração Fungicida Mínima (CFM) de aldiminas para fungos do gênero *Cryptococcus*

Depois de determinada a concentração mínima inibitória (CIM) para cada aldimina testada, foi realizado também o teste da concentração fungicida mínima (CFM) para avaliá-las quanto a ação fungicida ou fungistática frente

aos 12 isolados de *Cryptococcus neoformans* e 12 isolados de *Cryptococcus gattii*. Para tanto, alíquotas de 100 µL foram removidas dos poços nos quais não foi detectado crescimento visível na CIM, subcultivados em Agar Sabouraud dextrose (ASD) e incubadas a 35°C. A CFM foi definida como a menor concentração do composto em que nenhuma colônia foi observada após 72 horas de incubação.

A **Tabela 5** apresenta os valores da concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos testados e do antifúngico Fluconazol, usado como controle positivo. As fórmulas estruturais desses compostos estão representadas na **Figura 4**.

**Tabela 5:** Dados referentes à avaliação da concentração fungicida mínima (CFM) de nove aldiminas derivadas do 2-aminofenol contra 12 linhagens de *Cryptococcus neoformans* e 12 linhagens de *C. gattii*. CFM 50: concentração fungicida mínima; CFM 50: concentração fungicida mínima para 50% dos isolados testados; CFM 90: concentração fungicida mínima para 90% dos isolados testados.

	Aldiminas											
	2	20	7	8	15	16	18	31	29	41	50	Fluconazol*
Linhagens	CFM** (µg/mL)											
ATCC 24067	32.0	32.0	32.0	16.0	16.0	22.6	45.3	45.3	32.0	11.3	4.0	64.0
ATCC 28957	22.6	11.3	11.3	11.3	11.3	22.6	32.0	32.0	11.3	4.0	4.0	32.0
ATCC 62066	4.0	2.8	4.0	2.8	5.7	11.3	11.3	2.8	4.0	5.7	2.8	16.0
F10	8.0	22.6	22.6	16.0	11.3	32.0	45.3	45.3	22.6	2.0	2.0	16.0
Lmm 820	22.6	64.0	32.0	16.0	22.6	32.0	45.3	128.0	45.3	8.0	8.0	16.0
VM	11.3	16.0	45.3	16.0	22.6	22.6	45.3	128.0	64.0	11.3	11.3	8.0
C31	8.0	16.0	8.0	11.3	16.0	22.6	64.0	22.6	16.0	4.0	2.8	4.0
Wp	32.0	22.6	45.3	16.0	16.0	45.3	45.3	128.0	32.0	11.3	5.7	64.0
5396	16.0	22.6	22.6	8.0	5.7	45.3	64.0	64.0	32.0	2.8	2.8	22.6
96806	5.7	8.0	16.0	8.0	5.7	16.0	22.6	22.6	5.7	2.8	4.0	64.0
27JF	32.0	32.0	90.5	22.6	11.3	32.0	64.0	128.0	45.3	8.0	8.0	64.0
28JF	16.0	22.6	64.0	11.3	16.0	32.0	32.0	128.0	22.6	8.0	11.3	22.6
média geométrica	14.3	18.0	25.2	11.6	12.0	26.1	39.2	49.4	21.4	5.7	4.8	24.0
CFM 50**	16.0	22.6	22.6	11.3	11.3	22.6	45.3	45.3	22.6	5.7	4.0	22.6
CFM 90**	32.0	32.0	64.0	16.0	22.6	45.3	64.0	128.0	45.3	11.3	11.3	64.0
faixa	4,0-32,0	2,8-64	4-90,5	8,0-22,6	5,7-22,6	11,3-64	22,6-64	2,8-128	4,0-64,0	2-11,3	2,0-11,3	4,0-64,0
ATCC 24065	11.3	32.0	32.0	16.0	11.3	16.0	22.6	22.6	22.6	2.8	2.8	64.0
ATCC 32608	32.0	64.0	32.0	22.6	11.3	22.6	32.0	128.0	45.3	8.0	11.3	32.0
L135/03	32.0	64.0	45.3	45.3	8.0	45.3	45.3	90.5	64.0	8.0	16.0	45.3
L28/02	64.0	64.0	32.0	45.3	16.0	45.3	32.0	90.5	64.0	5.7	11.3	64.0
23/10993	16.0	11.3	32.0	11.3	16.0	32.0	32.0	45.3	22.6	4.0	5.7	22.6
196L/03	22.6	22.6	32.0	32.0	11.3	22.6	90.5	64.0	22.6	5.7	5.7	32.0
1913	22.6	22.6	32.0	32.0	11.3	22.6	64.0	64.0	32.0	5.7	4.0	16.0
547	32.0	45.3	32.0	32.0	16.0	22.6	45.3	32.0	16.0	5.7	5.7	>64
L27	22.6	128.0	45.3	64.0	16.0	45.3	64.0	90.5	64.0	5.7	16.0	64.0
818	22.6	64.0	45.3	22.6	11.3	32.0	32.0	32.0	8.0	4.0	5.7	32.0
L24/01	32.0	45.3	22.6	22.6	8.0	16.0	32.0	64.0	45.3	4.0	11.3	64.0
29/10893	8.0	45.3	32.0	11.3	8.0	22.6	22.6	32.0	11.3	2.0	4.0	22.6
média geométrica	23.3	42.7	33.9	26.1	11.6	26.9	39.2	55.4	28.5	4.8	7.1	38.0
CFM 50**	22.6	45.3	32.0	22.6	11.3	22.6	32.0	64.0	22.6	5.7	5.7	32.0
CFM 90**	32.0	64.0	45.3	45.3	16.0	45.3	64.0	90.5	64.0	8.0	16.0	64.0
faixa	8,0-64,0	11,3-128	22,6-45,3	11,3-64,0	8,0-16,0	16,0-45,3	22,6-90,5	22,6-128	8,0-64	2,0-8,0	2,8-16	16->64

\* Fluconazol foi utilizado como controle positivo

\*\*CFM: Concentração Fungicida Mínima matar 50% (CFM50) ou 90% (CFM90) dos isolados testados.

**Exemplo 6: Creme Base Aniônico (Lanette)**

A aldimina **2** (**Figura 4**) foi preparada na forma de creme base aniônico (Lannette), com tipo de emulsão de óleo e água. A concentração do composto **2** na formulação foi de 10%. Os componentes e quantidades da emulsão cremosa estão relacionados na **Tabela 6**.

**Tabela 6:** Composição de emulsão cremosa contendo aldimina **2**.

COMPONENTES		QUANTIDADE (g)
FASE AQUOSA	EDTA dissódico	0,15
	Solução conservante de parabenos	3,30
	Água	q.s.p. 100,00
FASE OLEOSA	Álcool cetílico	2,50
	Álcool cetoestearílico e	24,00
	cetilestearilsulfato de sódio (9:1)	
	Glicerina	5,00
	Oleato de decila	12,00

**Exemplo 7: Gel de Carboximetilcelulose a 1%**

A aldimina **2** foi manipulada na forma de gel de carboximetilcelulose a 1%. A concentração do composto **2** na formulação foi de 10%. Os componentes e quantidades do gel estão relacionados na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Composição de gel contendo aldimina **2**.

COMPONENTES	QUANTIDADES
Carboximetilcelulose (CMC)	1,00 g
Glicerina	8 mL
Cloreto de benzalcônio	1:1000
Água destilada	q.s.p. 100 mL

A solubilização da aldimina **2** até a concentração de 10% demonstra a maior versatilidade dessa classe de moléculas para elaboração de formulações tanto na forma de creme quanto de gel, uma vez que com o itraconazol só é possível obter a forma de emulsão cremosa na concentração máxima de 2%.

### **Exemplo 8: Ensaio *in vivo* de composições farmacêuticas contendo aldimina como princípio ativo**

Cerca de 10 mL de solução salina tamponada (PBS) foram adicionados à colônia do isolado ATCC28189 (NCQS40051) de *Trichophyton rubrum* com crescimento de 7-10 dias em Agar Batata-Dextrose (ABD). As colônias foram raspadas com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e a suspensão de estruturas fúngicas (conídios e hifas) foi filtrada em filtros Whatman-40 para que o inóculo fosse constituído apenas de conídios fúngicos. (SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 98-101, 2006).

Camundongos Balb/c selvagens foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de cloridrato de cetamina (80mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg) em PBS. Aproximadamente 10 minutos após a administração desta solução, os animais foram submetidos à infecção. O pelo foi raspado em duas diferentes partes do dorso, com posterior antissepsia com etanol 70%. Em seguida foram inoculados conídios de *T. rubrum* subcutaneamente na região raspada. Foram inoculados 10<sup>5</sup> conídios por animal. Um grupo controle foi inoculado com solução PBS. (GHANNOUM, M. A. *et al.* Determination of the efficacy of terbinafine hydrochloride nail solution in the topical treatment of dermatophytosis in a guinea pig model. *Mycoses*. v. 52, p. 35-43, 2008; SAUNTE, D. M. *et al.* Experimental guinea pig model of dermatophytosis: a simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Medical Mycology*. v. 46, p. 303-313, 2008)

O tratamento foi iniciado cinco dias após a infecção e teve duração de sete dias. Foi utilizada a aldimina **2** na formulação de creme e gel (**exemplos 6 e 7**, respectivamente), e o itraconazol a 2% na formulação de creme. Pelo fato da pouca solubilidade do itraconazol, não foi possível manipulá-lo na forma de gel, e a concentração máxima obtida na emulsão cremosa, devido a esse fator, foi de 2%. Os fármacos foram administrados diariamente de forma tópica (100 µg). Os animais foram monitorados quanto à redução dos sinais de dermatofitose. Animais infectados e não tratados foram utilizados como

controle positivo e o controle negativo foi representado por animais submetidos à inoculação de PBS.

A terapia antifúngica foi interrompida por 24 horas, quando foi realizada a anestesia, o raspado e biópsia do local infectado para a determinação do número de unidades formadoras de colônia por grama de tecido (UFC/g). Foram coletadas amostras de tecido, as quais foram homogeneizadas em PBS. A suspensão final em PBS foi plaqueada (50  $\mu$ L) em meio Ágar Batata Dextrosado (ABD). As placas foram incubadas a 28°C e a contagem do número de colônias foi realizada após quatro dias. O número de unidades formadoras de colônias foi calculado. O resultado foi expresso em UFC/g de tecido. A confirmação da identidade do fungo foi feita por meio da observação das características macro e micromorfológicas (microcultivo) das colônias desenvolvidas.

Após a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados e sacrificados para descarte conforme procedimentos padronizados e recomendados por comitês internacionais de ética em pesquisa animal. Estes procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo nº 251/2010

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunns foi empregado para comparação entre os grupos experimentais. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

A **Figura 5** apresenta os resultados obtidos no experimento. Foi verificada redução de crescimento significativa em todos os tratamentos utilizados em comparação ao grupo controle ( $p = 0,004$ ), apontando para a eficácia do tratamento da aldimina **2** tanto em creme quanto em gel para o tratamento de dermatofitoses. A aldimina **2** em gel foi estatisticamente mais eficaz em reduzir o número de UFC/g de tecido em comparação com a aldimina **2** creme ( $p = 0,0043$ ), e em relação ao itraconazol ( $p = 0,0023$ ). Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato da maior afinidade da molécula de

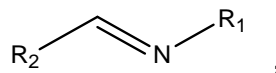


aldimina **2** pela formulação em emulsão cremosa, o que promoveria menor disponibilização da droga para o tecido animal, o mesmo provavelmente não ocorre com o gel, facilitando assim a penetração nos tecidos dos camundongos infectados. Estes resultados reforçam que as aldiminas e seus derivados são

5 uma fonte potencial de novos agentes para o tratamento de dermatofitoses.

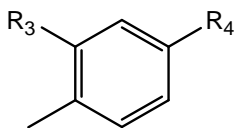
## REIVINDICAÇÕES

- 1) Compostos derivados de aldimina, caracterizados por apresentarem as fórmulas estruturais:**

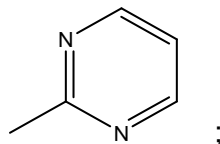


5

onde:  $R_1$  é



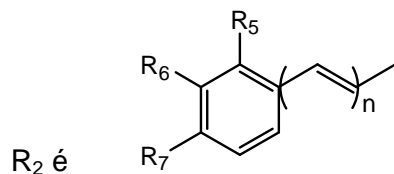
ou



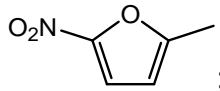
;

$R_3$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-OH$ ,  $-CN$  ou  $-OCH_3$ ;

$R_4$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-F$ ,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-NO_2$  ou  $-SCH_3$ ;



ou



;

10

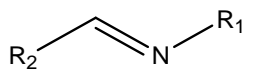
$R_5$  é  $-H$ ,  $-OH$  ou  $-NO_2$ ;

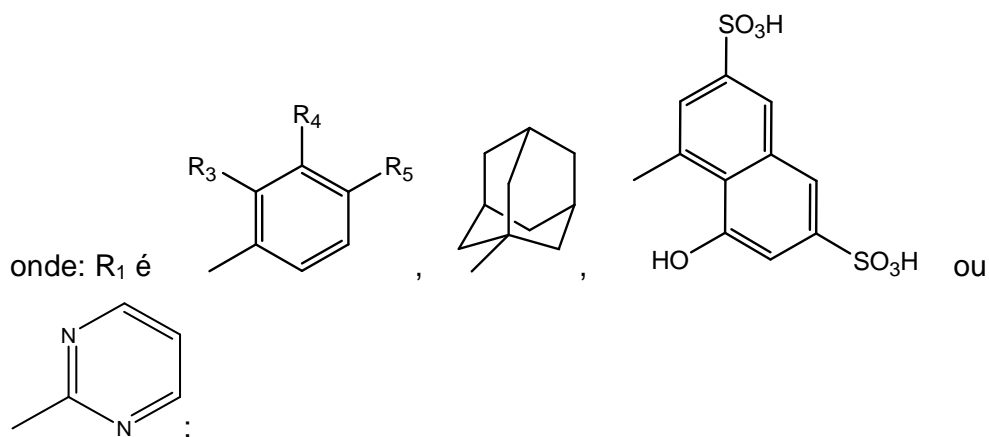
$R_6$  é  $-H$  ou  $-OH$ ;

$R_7$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-F$ ,  $-OH$  ou  $-OCH_3$ ; e,  $n$  é 1 ou 0.

- 2) Uso dos compostos de fórmulas estruturais**

15

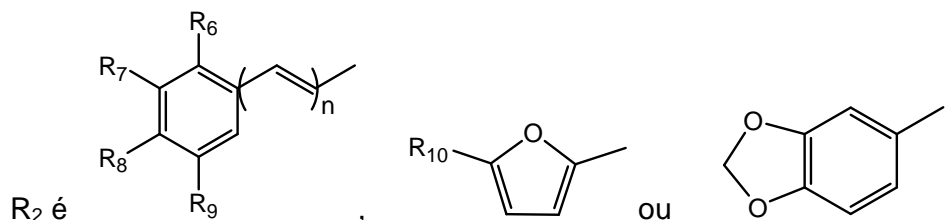




R<sub>3</sub> é selecionado do grupo compreendendo -H, -OH, -CN ou -OCH<sub>3</sub>;

R<sub>4</sub> é -H ou -OH;

- 5 R<sub>5</sub> é selecionado do grupo compreendendo -H, -F, -Cl, -OH, -CN, -CF<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SCH<sub>3</sub> ou -OCH<sub>3</sub>;



R<sub>6</sub> é -H, -OH ou -NO<sub>2</sub>;

R<sub>7</sub> é -H ou -OH;

- 10 R<sub>8</sub> é selecionado do grupo compreendendo -H, -F, -OH, -NO<sub>2</sub> ou -OCH<sub>3</sub>;

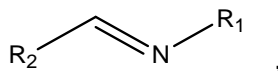
R<sub>9</sub> é -H ou -OH;

R<sub>10</sub> é -H ou -NO<sub>2</sub>; e,

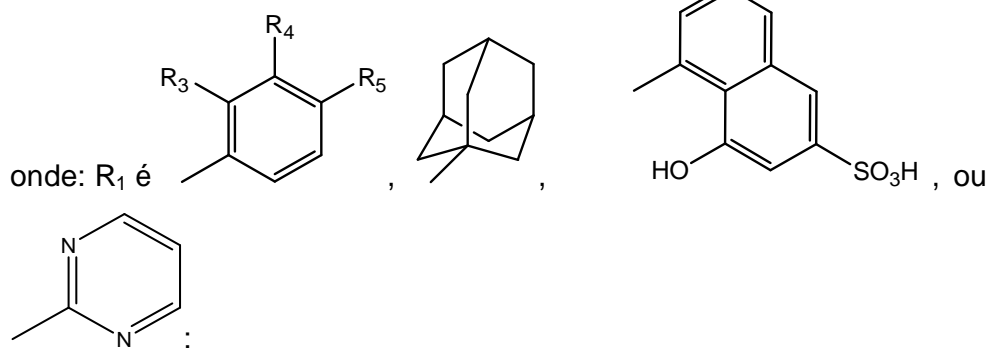
- 15 n é 0 ou 1, **caracterizado por** ser na preparação de composições farmacêuticas para tratar infecções fúngicas de importância médica e/ou veterinária.

**3) Uso dos compostos, de acordo com reivindicação 2, caracterizado pelas** infecções fúngicas serem causadas preferencialmente por fungos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Paracoccidioides*, *Aspergillus*, *Fonsecaea*, *Trichophyton* e *Microsporum*.

**4) Composição farmacêutica, caracterizada por** compreender pelo menos um dos compostos representados pelo grupo que apresenta fórmula estrutural:

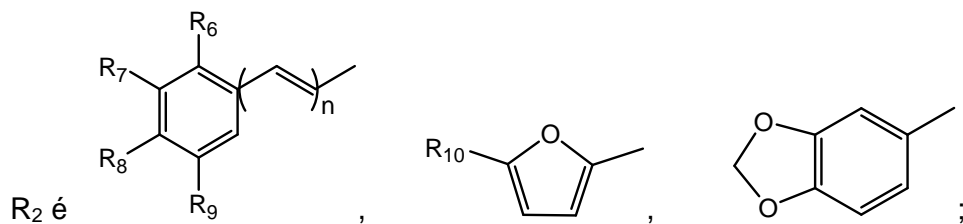


5



10

$R_3$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-OH$ ,  $-CN$  ou  $-OCH_3$ ;  
 $R_4$  é  $-H$  ou  $-OH$ ;  
 $R_5$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-F$ ,  $-Cl$ ,  $-OH$ ,  $-CN$ ,  $-CF_3$ ,  $-NO_2$ ,  $-SCH_3$  ou  $-OCH_3$ ;



15

$R_6$  é  $-H$ ,  $-OH$  ou  $-NO_2$ ;  
 $R_7$  é  $-H$  ou  $-OH$ ;  
 $R_8$  é selecionado do grupo compreendendo  $-H$ ,  $-F$ ,  $-OH$ ,  $-NO_2$  ou  $-OCH_3$ ;  
 $R_9$  é  $-H$  ou  $-OH$ ;  
 $R_{10}$  é  $-H$  ou  $-NO_2$ ; e

n é 0 ou 1, associado a um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

- 5      **5) Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por** ser apresentada nas formas líquida, semissólida ou sólida.
- 6) **Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por** ser administrada pelas vias intramuscular, intravenosa, subcutânea, tópica, oral, inalatória ou por dispositivos que possam ser implantados ou injetados.
- 10     **7) Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por** ser na forma de emulsão compreendendo EDTA dissódico, solução conservante de parabenos, água, álcool cetílico, álcool cetoestearílico e cetilestearilsulfato de sódio combinados na proporção de 9:1, glicerina e oleato de decila.
- 15     **8) Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por** ser na forma de gel compreendendo carboximetilcelulose, glicerina, cloreto de benzalcônio e água.

## FIGURAS

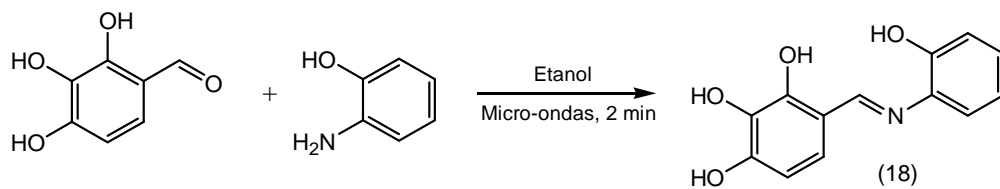


Figura 1A

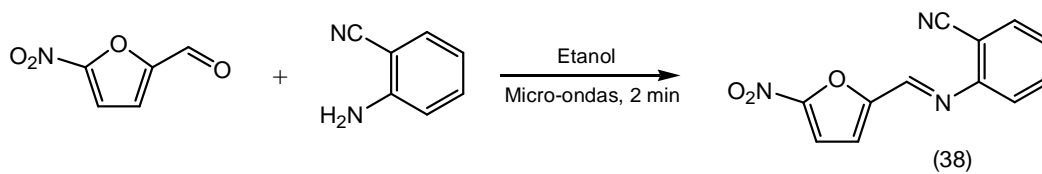


Figura 1B

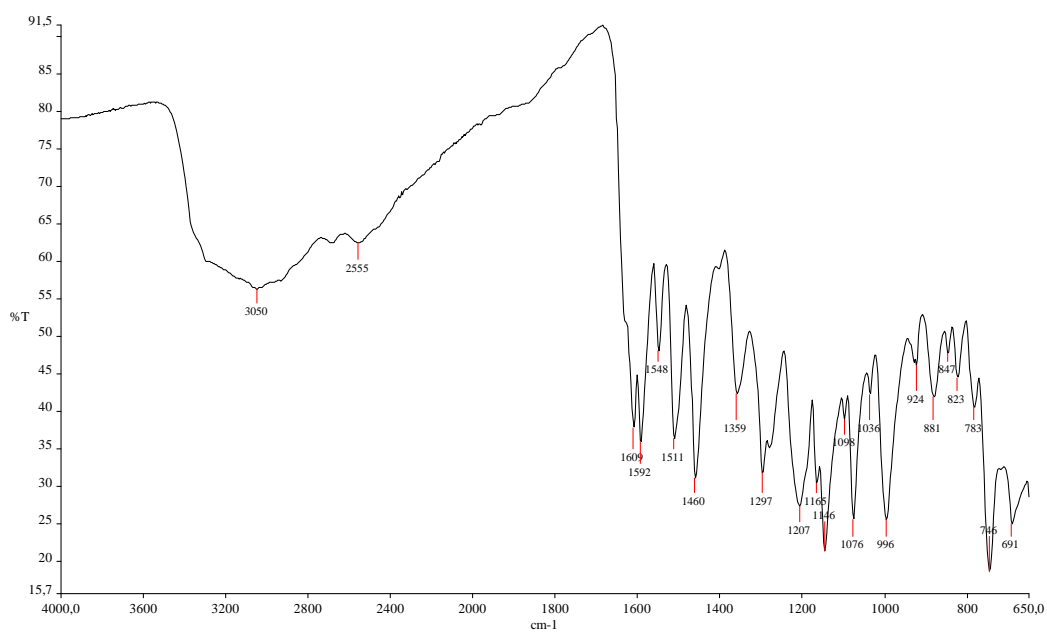


Figura 2A

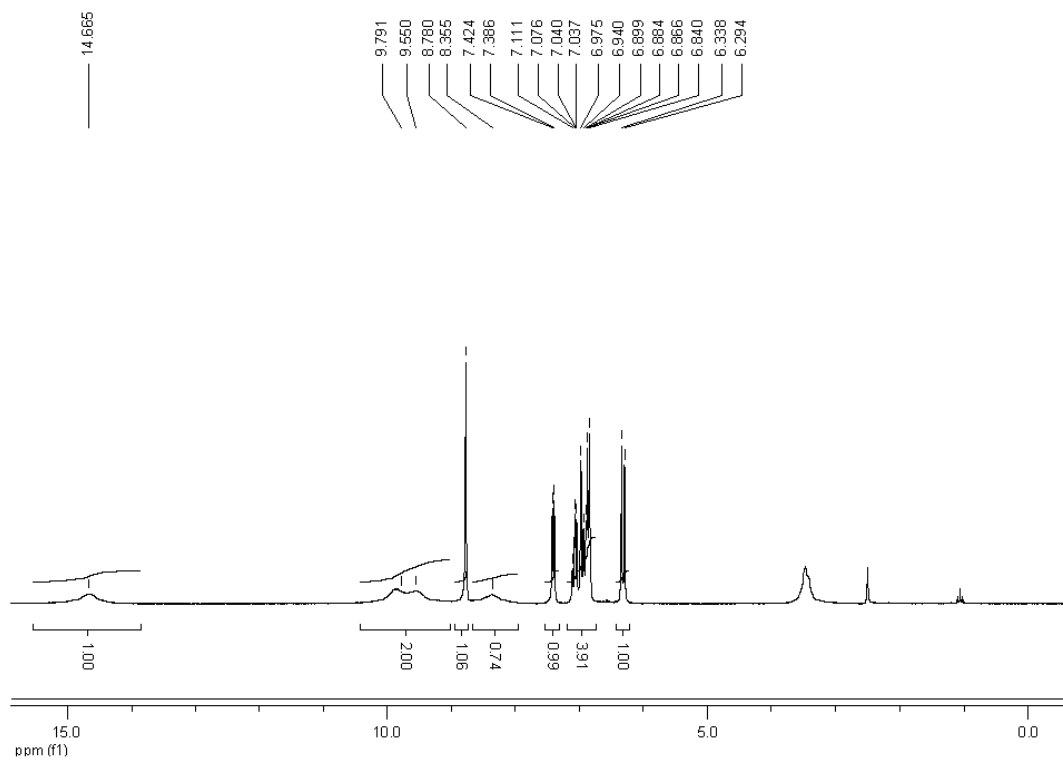


Figura 2B

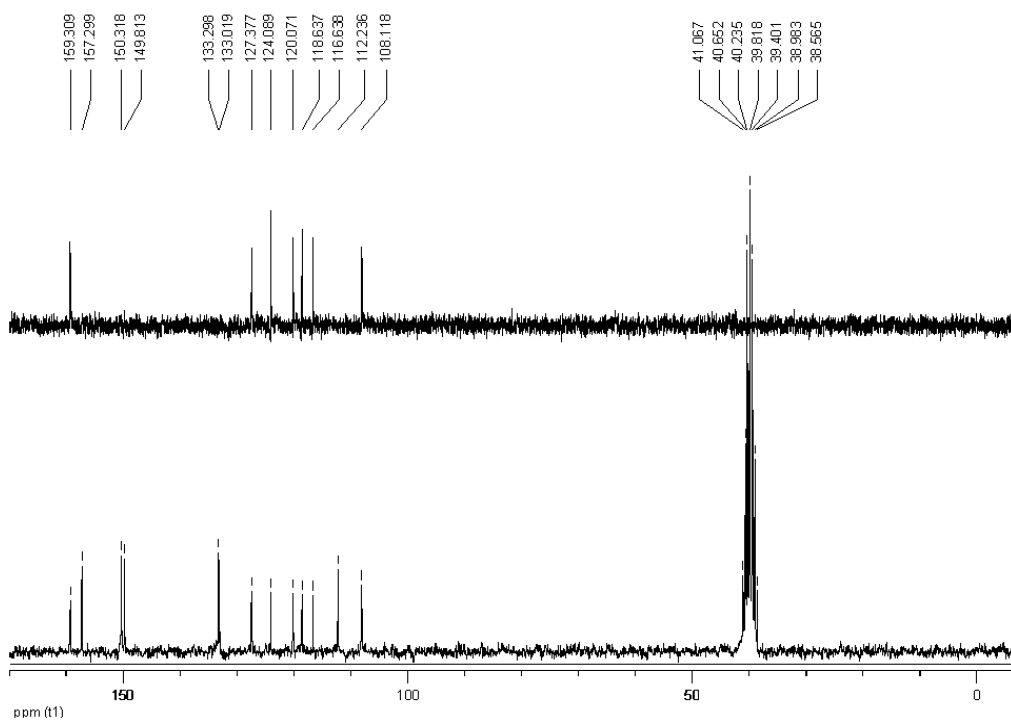


Figura 2C

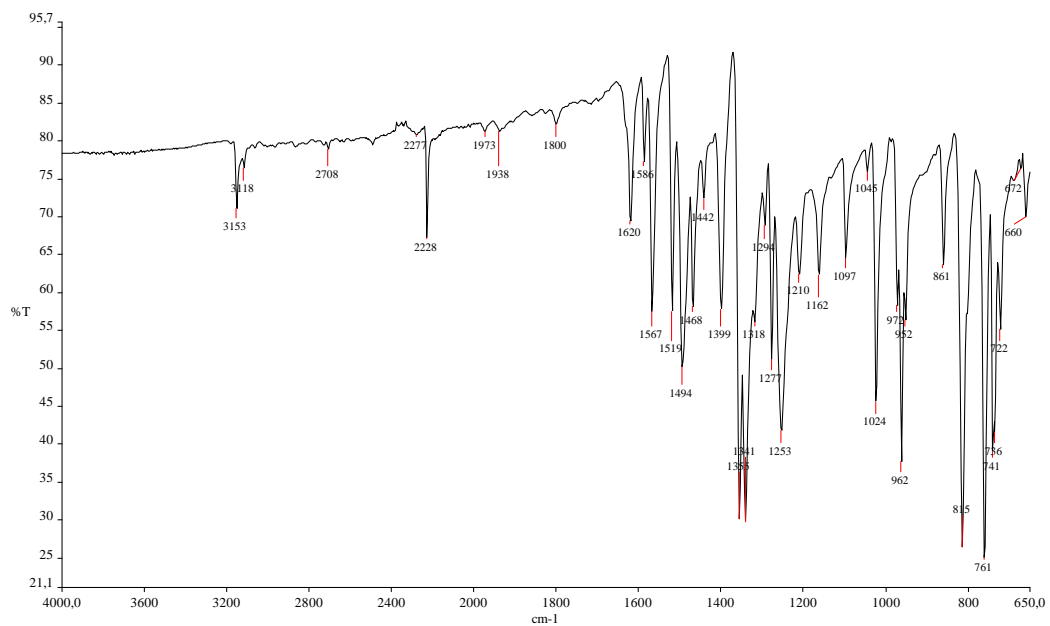


Figura 3A

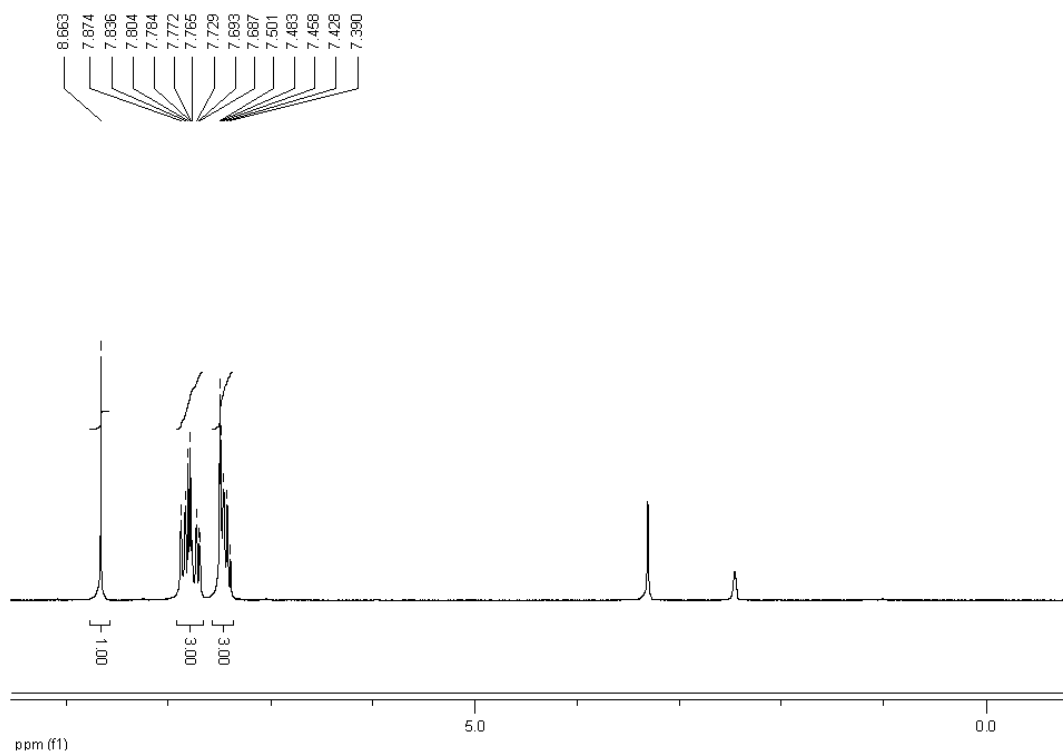


Figura 3B



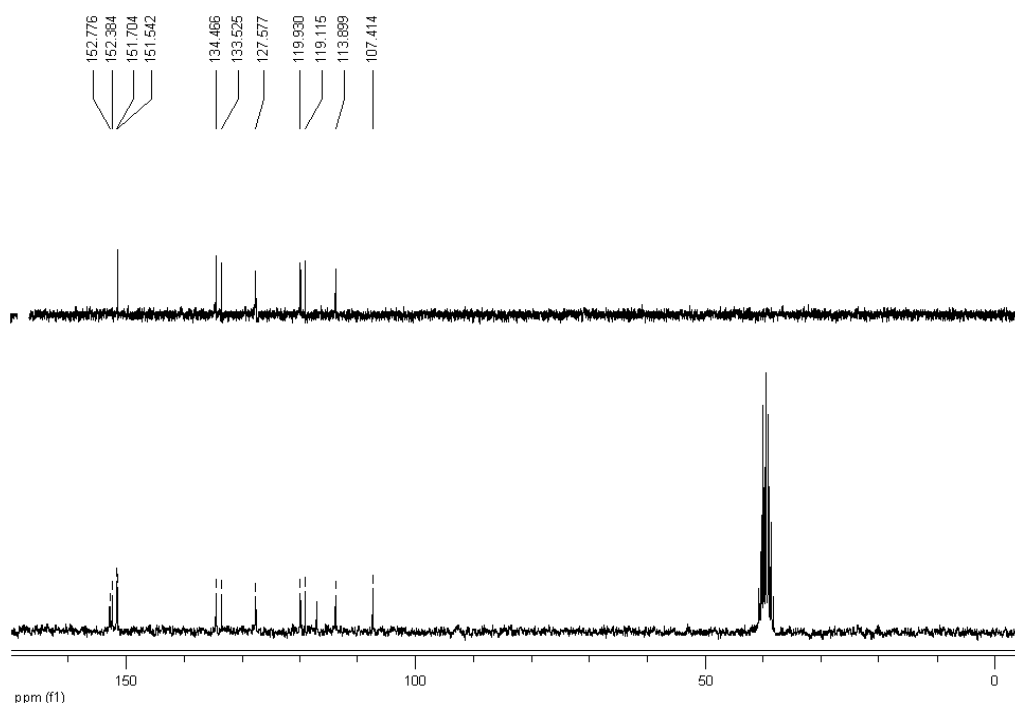


Figura 3C

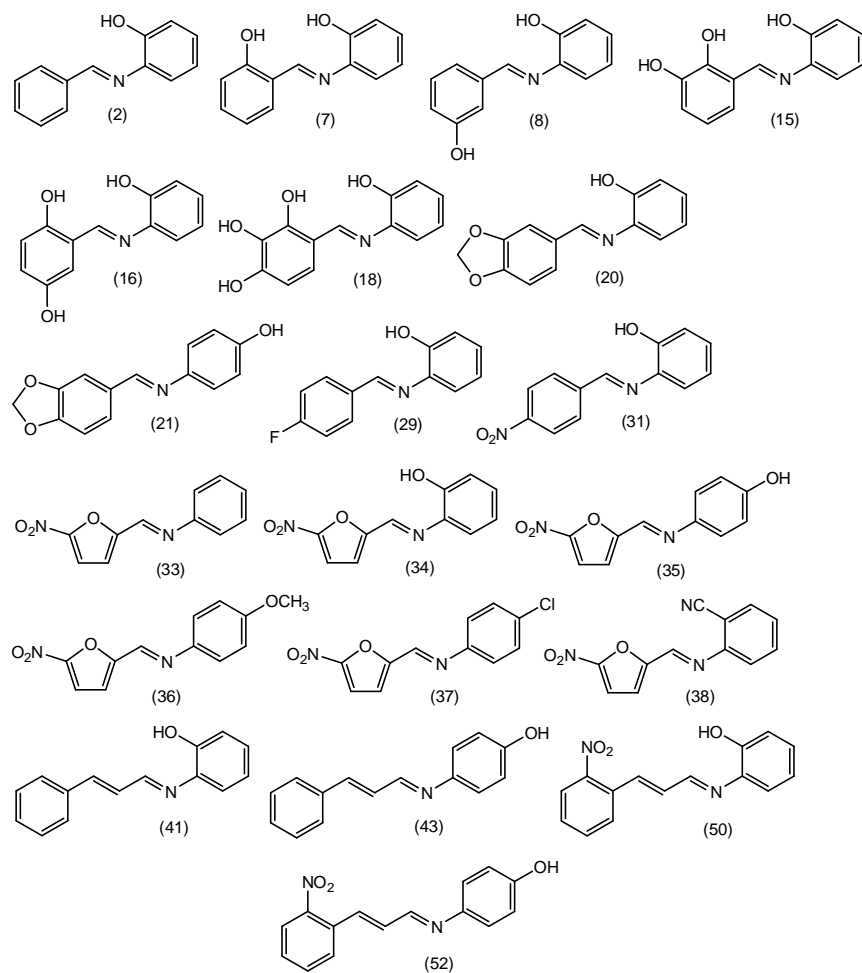


Figura 4

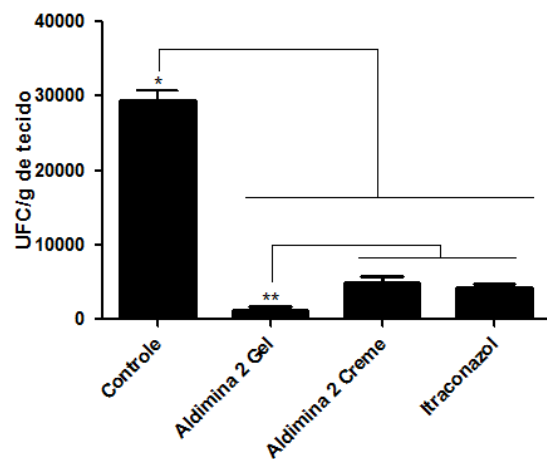


Figura 5

## RESUMO

### **“COMPOSTOS DERIVADOS DE ALDIMINAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO”**

A presente invenção compreende compostos derivados de aldiminas, bem como composições farmacêuticas contendo tais compostos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis, além de sua utilização no tratamento de infecções fúngicas de importância médica e/ou veterinária. As aldiminas e seus derivados demonstraram apresentar uma ação antifúngica igual ou melhor que a dos medicamentos disponíveis no mercado, como o fluconazol. Por serem drogas novas, a resistência dos patógenos a elas é bastante reduzida. A síntese das aldiminas é realizada através de um processo com etapa única em que a reação se desenvolve no tempo de dois minutos e com rendimentos entre 70-98%, o que viabiliza a sua produção em larga escala, já que é um processo rápido e de baixo custo, quando comparado ao dos outros fármacos disponíveis.