



(11) *Número de Publicação:* PT 778733 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

A01N063/00 A C11D003/386 B

C11D003/48 B C11D003/38 B

A23L003/3571 B A23L003/3526 B

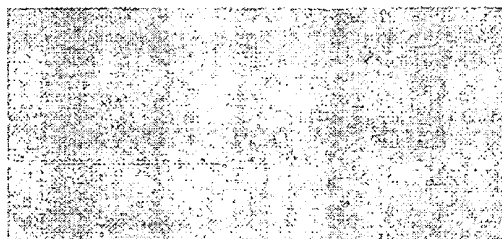
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.09.01	(73) <i>Titular(es):</i> NOVOZYMES A/S KROGSHOEJVEJ 36 DK-2880 BAGSVAERD DK
(30) <i>Prioridade:</i> 1994.09.01 DK 101194	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.06.18	(72) <i>Inventor(es):</i> CHARLOTTE JOHANSEN DK
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.12.20	(74) <i>Mandatário(s):</i> MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA RUA D. JOÃO V, 9, 2º AND.-DTO. 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* COMPOSIÇÃO PROTÉICA BÁSICA PARA MATAR OU INIBIR CÉLULAS MICROBIANAS

(57) *Resumo:*

COMPOSIÇÃO PROTÉICA BÁSICA PARA MATAR OU INIBIR CÉLULAS MICROBIANAS



448433

MEMORIA DESCRITIVA

COMPOSIÇÃO PROTÉICA BÁSICA PARA MATAR OU INIBIR CÉLULAS MICROBIANAS

A presente invenção refere-se a uma composição capaz de matar células microbianas ou de inibir o crescimento de células microbianas, ou seja, uma composição bactericida, bacteriostática, fungicida e/ou fungistática; uma composição de limpeza ou para detergente que inclui uma substância capaz de matar células microbianas ou de inibir o crescimento de células microbianas; e métodos para matar células microbianas presentes numa superfície dura, sobre a pele ou na filtragem e para conservar produtos alimentícios, cosméticos etc.

ESTADO DA TECNICA

Nesta época de grande interesse público pela redução do uso de aditivos químicos, é importante considerar as alternativas naturais dos agentes antimicrobianos que se empregam, por exemplo, para conservar alimentos, o modo de desinfetantes e o modo de componentes antimicrobianos nos detergentes e nas composições de limpeza. Isto cobra um especial interesse quando a conservação se leva a cabo mediante cultivos bacterianos (Jeppesen & Huss 1993) e enzimas como a lactoperoxidase (Farrag & Marth 1992), a glicose-oxidase (Jeong et al. 1992) e a lisozima (Johansen et al. 1994).

As protaminas são proteínas básicas com um alto conteúdo em arginina encontrada em associação com o ADN de núcleos de espermatozóide de peixes, pássaros, mamíferos etc.. (Rodman et al. 1984; Kossel 1928). A protamina usa-se com fins clínicos em modo de antídoto para a heparina (Jaques 1973) e em modo de suporte de insulina, prolongando a absorção da insulina administrada por via subcutânea (Brange 1987). Também se deu atenção a propriedades

funcionais da protamina o modo de agente estabilizante (Phillips et al. 1989). Demonstrou-se que a protamina possui um efeito antibacteriano (Hitsch 1958), porém não se estudou em profundidade este aspecto.

Conhecem-se as combinações sinérgicas das protaminas com a polilisina ou a lisozima a partir de JP-A-63109762, JP-A-2002329 e JP-A-5276910.

As bactérias Gram-negativas com frequência mostram-se resistentes ante um número elevado de agentes nocivos devido à função de barreira eficaz ante a permeabilidade da membrana externa (Nakae 1985). Mas, a protamina e a maior parte do resto dos peptídeos catiónicos podem, aparentemente, atravessar a membrana externa das bactérias Gram-negativas quando se vêm submetidos a determinadas condições (Vaara 1992, Vaara & Vaara 1983), provavelmente como resultado do seu enlace a superfície aniônica coberta de lipopolisacáridos da célula Gram-negativa. O mecanismo da acção antibacteriana dos peptídeos básicos não sendo conhecido, porém foi sugerido que formam um canal na membrana citoplásmica e, deste modo, separam o transporte electrónico e causam uma perda (Christensen et al. 1988; Hugo 1978; Kagan et al. 1990). Também se propôs que induziram uma autólise devido a activação das enzimas autolíticas (Bierbaum & Sahl 1991).

Em geral, é muito raro que se dê peptídeos básicos na sua maior parte como, por exemplo, a protamina na natureza. Mas, a partir do que se estudou, descobriu-se que vários deles apresentam propriedades antibacterianas: por exemplo, a nisina (Sahl 1987), a defensina (Lehrer et al. 1993), a cecropinas (Christensen et al. 1988), o Pep5 (Bierbaum & Sahl 1987) e as melittinas (Vaara 1992).

A actividade antibacteriana normalmente mede-se por uma redução no reconto de colónias, por uma redução na absorvência de uma suspensão bacteriana ou por zonas de inibição sobre placas de agar (Trevors 1986). Mas, estes métodos podem não ser adequados para avaliar o efeito antibacteriano de um peptídico básico ou de proteína como a protamina devido a aglutinação de protaminas carregadas positivamente e de células bacterianas carregadas negativamente, tal e como descreve Islam et al. (1984).

Deste modo, o objectivo de invenção era proporcionar uma composição antibacteriana e/ou antifungicida que incluíra um composto ou substância activa natural, ou seja, que não fora tóxica, que tivera origem biológica, que se pudera encontrar facilmente e que custara relativamente pouco, opcionalmente em combinação com outros compostos ou substâncias antimicrobianas.

RESUMO DA INVENÇÃO

Descobriu-se surpreendentemente que sendo possível matar células microbianas ou inibir o crescimento de células microbianas mediante uma proteína básica ou um peptídico de origem biológica, por exemplo, a protamina ou o sulfato de protamina. Para determinadas bactérias ou fungos, poderia ser necessário combinar a proteína básica com uma enzima que degrade a parede celular ou uma oxidorreductase para obter o efeito antimicrobiano desejado.

Em consequência, investigou-se o efeito de inibição do crescimento da protamina e o efeito letal potencial dessa proteína básica sobre células que não estão em crescimento. Devido às faltas metodológicas de anteriormente, utilizaram-se medidas impedimétricas e compararam-se com os re-contos tradicionais de placas (Firstenberg-Eden & Eden 1984; Connolly et al. 1993).

Deste modo, com base nestas conclusões, a presente invenção cria uma composição bactericida, bacteriostática, fungicida e/ou fungistática que inclui um peptídico ou proteína básica capaz de matar células microbianas em combinação com uma enzima que degrada a parede celular ou uma oxidorreductase.

Noutro aspecto, a presente invenção cria um detergente ou uma composição de limpeza que compreende um peptídico ou proteína básica capaz de matar células microbianas e um surfactivo. Essas composições têm um pH na margem alcalino e descobriu-se que as proteínas básicas como a protamina e o sulfato de protamina mostram seu efeito antimicrobiano óptimo em um pH alcalino, fazendo deste modo que essas proteínas sejam muito adequadas para a sua incorporação em composições que tenham como objectivo limpar.

A composição da invenção sendo útil como ingrediente antimicrobiano em todos os casos nos que se precise de um ingrediente deste tipo como, por exemplo, para conservar alimentos, bebidas, cosméticos, produtos para lentes de contacto, ingredientes de alimentos ou composições enzimáticas; como desinfectante para uso, por exemplo, na pele de humanos ou animais, membranas mucosas, feridas, machucados ou nos olhos; para acabar com as células microbianas na filtragem; e para agrega-la em composições de limpeza para o lavado de superfícies duras.

DESENHOS

A invenção é, além disso, ilustrada mediante os desenhos, nos que:

A figura 1 mostra o efeito da protamina sobre o crescimento da *Yersinia enterocolitica* que se desenvolve em TSB a 25°C. O crescimento mede-se como o % de mudanças na condutância;

A figura 2 mostra a curva de calibração que faz referência aos tempos descritos da condutância ▲ (*Shewanella putrefaciens* cepa A2) ou da capacitância ■ (*Listeria monocytogenes* cepa O32) em TSB a 25°C para o re-conto de colónias que carecem de protamina;

A figura 3 mostra o efeito de diferentes concentrações de protamina sobre as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* dependendo do pH.

A figura 4 mostra o efeito de diferentes concentrações de protamina sobre as bactérias Gram-positivas *Listeria monocytogenes* dependendo da concentração celular (inóculo, log CFU/ml).

A figura 5 mostra o efeito de diferentes concentrações de protamina sobre as bactérias Gram-negativas *Shewanella putrefaciens* dependendo da concentração celular (inóculo, log CFU/ml).

A figura 6 é um plano da superfície de resposta que mostra o efeito sinérgico de uma composição segundo a invenção (diferentes concentrações de protamina e lisozima) sobre as bactérias Gram-negativas *Shewanella putrefaciens* dependendo da concentração celular (inóculo, log CFU/ml).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

No presente contexto, deve-se entender o termo "bactericida" como capaz de matar células bacterianas.

No presente contexto, deve-se entender o termo "bacteriostático" como capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, de inibir as células bacterianas em crescimento.

No presente contexto, deve-se entender o termo "fungicida" como capaz de matar células micóticas.

No presente contexto, deve-se entender o termo "fungistático" como capaz de inibir o crescimento micótico, ou seja, de inibir as células micóticas em crescimento.

Deve-se entender o termo "célula em crescimento" como uma célula que tem acesso aos nutrientes adequados e, deste modo, é capaz de reproduzir-se/propagar-se. O termo "célula que não está em crescimento" utiliza-se para fazer referência a uma célula viva, ainda que em estado de repouso, ou seja, a uma célula num estado onde não cresce, não se divide, não se multiplica e não toma energias, com processos metabólicos ao mínimo.

Com o termo "enzima que degrada a parede celular" faz-se referência a um enzima que degrada os componentes da membrana celular, por exemplo, os peptidoglucanos como a mureína e a pseudomureína; a quitina; e o ácido teicoico. Alguns exemplos de enzimas que degradam a parede celular que resultam úteis nas composições da presente invenção são as endoglicosidase Tipo II, por exemplo, as endoglicosidase Tipo II de na EP-A2-0 425 018, os lisozimas e as quitinase.

O termo "aminoácidos presentes nas células dos mamíferos" denota os 20 aminoácidos que constituem as proteínas que são parte dos mamíferos, ou seja, alanina, arginina, asparraguina, ácido aspártico, cisteína, glotamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina. Preferivelmente, as proteínas ou peptídeos básicos da composição segundo a invenção se compõe

de um ou mais dos 20 aminoácidos mencionados, ou seja, as proteínas ou peptídeos básicos não se poderão recuperar a partir de, por exemplo, bactérias como a nisina e o Pep5.

O termo "oxidorreductasa" faz referência a um enzima classificado como EC 1. segundo Enzyme Nomenclature (1992), ou seja, qualquer enzima classificado como EC 1.1 (que actue sobre o grupo CH-OH de doadores), EC 1.2 (que actue sobre o grupo de aldeídos ou oxos de doadores), EC 1.3 (que actue sobre o grupo CH-CH de doadores), EC 1.4 (que actue sobre o grupo CH-NH₂ de doadores), EC 1.5 (que actue sobre o grupo CH-NH de doadores), EC 1.6 (que actue sobre NADH ou NADPH), EC 1.7 (que actue sobre outros compostos ao nitrogénio como doadores), EC 1.8 (que actue sobre um grupo sulfureto de doadores), EC 1.9 (que actue sobre um grupo hemo de doadores), EC 1.10 (que actue sobre difenóis e substâncias relacionadas como doadores), EC 1.11 (que actue sobre um peróxido como aceitante), EC 1.12 (que actue sobre o hidrogénio como doador), EC 1.13 (que actue sobre doadores únicos com incorporação de oxigénio molecular (oxigenase), EC 1.14 (que actue sobre pares de doadores com incorporação de oxigénio molecular), EC 1.15 (que actue sobre radicais de superóxido como aceitante), EC 1.16 (iões de metal derivados de agentes oxidantes), EC 1.17 (que actue sobre grupos -CH₂), EC 1.18 (que actue sobre ferredoxina reduzida, como doador), EC 1.19 (que actue sobre flavodoxina reduzida, como doador) e EC 1.97 (outras oxidorreductase).

O termo "sistema de enzimas de peroxidase" faz referência a uma peroxidase (EC 1.11.1) em combinação com uma fonte de peróxido de hidrogénio que pode ser peróxido de hidrogénio ou um precursor de peróxido de hidrogénio para a produção in situ de peróxido de hidrogénio, por exemplo, percarbonato ou perborato, ou um sistema de enzimas para a produção de peróxido de hidrogénio, por exemplo, uma oxidase e um substrato para a oxidase ou uma

aminoácidoxidade e um aminoácido adequado, ou um ácido peroxicarboxílico ou um sal derivado.

Alguns exemplos de peroxidase úteis são a lactoperoxidase, a peroxidase da alfafa, a peroxidase produzível mediante o cultivo de uma peroxidase que produz a cepa *Myxococcus virescens*, DSM 8593, *Myxococcus fulvus*, DSM 8969, ou *Myxococcus xanthus*, DSM 8970, a partir de uma peroxidase que produz cepa do género *Corallococcus*, preferivelmente que pertence a *Corallococcus coralloides*, DSM 8967, ou a *Corallococcus exiguus*, DSM 8969.

No caso da lactoperoxidase, pode-se utilizar o tiocianato o modo de substrato.

As lacases são enzimas que catalisam a oxidação de um substrato com oxigénio; se souber, que têm uma origem microbiana, vegetal e animal. Mais especificamente, as lacases (EC 1.10.3.2) são oxidoreductase que funcionam com oxigénio molecular o modo de aceitante electrónico. Normalmente, haverá suficiente oxigénio molecular na atmosfera, de maneira que não será necessário agregar oxigénio extra no meio do processo. Alguns exemplos de uma enzima lacase útil nos composições da presente invenção são a lacase obtenível a partir da cepa *Coprinus cinereus*, IFO30116, ou de uma lacase que conta com propriedades imunoquímicas idênticas às de uma lacase derivada de *Coprinus cinereus*, IFO30116; o obtenível a partir de uma cepa de *Myceliophthora thermophile* segundo se descreve na WO 91/05839.

O termo "células microbianas" faz referência a células micóticas ou bacterianas.

Pelo termo "de origem biológica" entende-se que a substância ou os compostos recuperam-se ou regeneram-se a partir de um material biológico como podem ser os seres humanos, os animais ou as plantas. De forma similar, o termo "de

origem microbiológica" faz referência a que a substância ou compostos se recuperam ou regeneram a partir de um material microbiológico como podem ser as bactérias, os fungos, a levedura ou a que um organismo microbiológico possa produzir um composto ou substância mãe ou nativa.

O termo "matéria biológica" faz referência a uma matéria obténível da natureza ou uma matéria que esteve viva anteriormente obténível da natureza.

O termo "polipeptídeo sintetizado" faz referência a um ensamble sintetizado, ou seja, a uma cadeia construída a partir de monômeros peptídeos. Os polipeptídeos que resultam úteis nas presentes composições são os polipeptídeos básicos, ou seja, os polipeptídeos e os polipeptídeos, assim como os copolímeros derivados delas. Prefere-se que os polipeptídeos tenham uma longitude de cadeia inferior a uns 100 aminoácidos, porém estabeleceu-se que os polipeptídeos inferiores a 1000 kD resultam úteis. Preferentemente, os polipeptídeos para usar na composição da invenção possuem uma longitude de cadeia ou peso molecular quase idêntico, porém as misturas de polipeptídeos que contam com longitudes de cadeia ou pesos moleculares diferentes também resultam úteis.

Contemplou-se que a proteína básica da composição da invenção pode ser uma proteína recombinante. No caso de se tratar da protamina, contempla-se que esta possa ser uma protamina recombinante, ou seja, produzida ao clonar uma sequência de ADN que codifique a proteína e a célula subsequente transformada mediante a sequência de ADN e expressada em um hospede, ou seja, um hospede micótico ou bacteriano adequado. Uma protamina/sulfato de protamina recombinante pode ser clonado e expressado segundo as técnicas convencionais standard para um experto na matéria.

As proteínas básicas que são preferidas para o seu uso nas composições da presente invenção são as protaminas, os sulfatos de protamina, as defensinas, as magaininas, a melittina, o cecropinas e as protegrinas; mais preferentemente as protaminas e os sulfatos de protamina.

Até agora sabe-se, que a protamina derivada do salmão tem um efeito bactericida sobre as bactérias Gram-positivas em crescimento (1000 mg/ml). Islam et al. (1984) descobriu que inibia o crescimento, porém não determinava se o efeito era bactericida ou bacteriostático. Outros estudos disseram que a protamina não se mostra eficaz contra as bactérias Gram-negativas (Islam et al. 1984; Yanagimoto et al. 1992). Contrariamente a esta observação, se acaba de descobrir que a protamina é eficaz contra as bactérias Gram-positivas, contra as bactérias Gram-negativas e contra os fungos. Isto mesmo também se aplica ao sulfato de protamina.

Foi sugerido que o efeito antibacteriano primário de muitos dos peptídeos básicos é a sua capacidade para penetrar na membrana citoplasmática, interrompendo o transporte electrónico, e induzir assim a perda de compostos intracelulares. Sem estar refreado com esta teoria, este mecanismo pode explicar em parte o efeito da protamina sobre algumas cepas avaliadas nos experimentos descritos nos exemplos que se enumeram abaixo.

Noutro aspecto, a presente invenção faz referência a uma composição de limpeza ou para detergente que inclui um peptídico ou proteína básica capaz de matar células microbianas e um surfactivo.

A composição para detergente ou de limpeza pode compreender, além disso, outras enzimas usadas, convencionalmente nessas composições. Preferentemente, a composição para detergente ou de limpeza da invenção

compreende ao menos uma enzima seleccionada do grupo consistente em protease, amilase, celulase e lipase.

O surfactivo da composição para detergente ou de limpeza é, preferivelmente, um surfactivo para detergente, sendo preferível que seja um surfactivo para detergente seleccionado entre o grupo consistente em surfactivo aniônicos, não iônicos, anfotéricos, de íon bipolar e catiónico.

Numa forma de realização preferida, a composição para detergente ou de limpeza compreende, como proteína básica, uma protamina ou um sulfato de protamina numa quantidade que é eficaz para matar células ou de inibir o crescimento das células, preferentemente numa quantidade correspondente a um valor entre 1 e 4000 mg por ml de solução de limpeza ou de solução de lavado, ainda que é preferível que seja um valor entre 1 e 2000 mg por ml de solução de limpeza ou solução de lavado, especialmente entre 5 e 1000 mg por ml de solução de limpeza ou solução de lavado.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso das composições da invenção com diferentes objectivos, ou seja, a invenção também faz referência a um método para matar células microbianas presentes numa superfície dura cujo método compreende fazer que a superfície entre em contacto com uma composição de limpeza produzida segundo a invenção, preferentemente uma composição que inclua uma protamina ou um sulfato de protamina, numa quantidade que seja eficaz para matar células.

Além disso, em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para matar células microbianas ou inibir o crescimento de células microbianas presentes na filtração cujo método compreende que a filtração entre em contacto com uma composição de detergente produzida segundo a presente invenção,

preferentemente uma composição que inclua uma protamina ou um sulfato de protamina, numa quantidade que seja eficaz para matar células ou inibir o crescimento das células.

Noutro aspecto, a invenção refere-se a um método para conservar alimentos, bebidas, cosméticos como, por exemplo, loções, cremes, géis, sabões, xampus, acondicionadores, desodorantes; produtos para lentes de contacto, ingredientes de alimentos ou composições de enzimas cujo método compreenda o incorporação nos alimentos, bebidas, cosméticos, produtos para lentes de contacto, ingredientes de alimentos ou composições de enzimas sem conservantes de uma proteína básica ou de um peptídico básico ou uma composição da presente invenção numa quantidade que seja eficaz para inibir o crescimento das células microbianas, preferentemente uma protamina ou um sulfato de protamina ou uma composição que inclua uma protamina ou um sulfato de protamina.

Noutro aspecto mais da invenção, faz-se referência a um método para matar células microbianas presentes na pele dos humanos ou dos animais, nas membranas mucosas, nas feridas, nos machucados ou nos olhos; método que compreende que as células que deva ser morta entrem em contacto com um peptídico ou uma proteína básica numa quantidade que seja eficaz para matar células, preferentemente uma protamina ou sulfato de protamina. Deste modo, as composições da invenção e/ou as proteínas ou os peptídeos básicos utilizados nestas composições, especialmente as protaminas e os sulfatos de protamina, podem ser úteis como desinfectantes, por exemplo, no tratamento contra a acne, infecções de olhos, infecções da pele; em desodorantes; para limpar e desinfetar as lentes de contacto, etc..

A invenção é ilustrada, a continuação, mediante os seguintes exemplos não limitativos.

EXEMPLO 1

Efeito bactericida e bacteriostático da protamina

Materiais e métodos

BACTÉRIAS, INÓCULOS, MEIOS E REATIVOS

As bactérias usadas, no estudo aparecem catalogadas na Tabela 1 abaixo. Os cultivos de aprovisionamento foram mantidos em caldo de soja de tripton (TSB)(oxoid CM129) com um 0,5% de glicose, um 2% de leite de em pó, um 4% de glicerol e armazenados a -80°C.

As células do caldo de cultivo foram depositadas sobre placas de TSB (TSB com um 1,2% de agar) e incubadas durante 48 h a 25°C. Inoculou-se uma colónia de bactérias em 5 ml de TSB e cresceram durante 24-36 h a 25°C. Este cultivo foi utilizado o modo de inóculo.

Utilizou-se TSB com um 1,2% de agar para efectuar o reconto de placas produzidas mediante a inoculação da superfície e a incubação das placas a 25°C. Prepararam-se taxas de diluição de dez capas usando salino de peptona estéril (0,1% de peptona, 0,85% de NaCl).

Obteve-se protamina de salmão (P-4005) da Sigma Chemical Company (St. Louis, EEUU), dissolvida em água destilada, esterilizada mediante filtros (0,2 µm) e usada, imediatamente depois da sua preparação.

Tabela 1

Cepas bacterianas ensaiadas para provar sua sensibilidade ante a protamina

Bactéria (referência)	Reacção Gram	Código (ref.)
<i>Aeromonas sobria</i> (g)	-	F4
<i>Aeromonas salmonicidae</i> (a)	-	AS1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (h)	-	AH2
<i>Shewanella putrefaciens</i> (j)/(k)/(k)/(k)	-	A2/A6/A11/A22
<i>Vibrio anguillarum</i> (b)	-	E2
<i>Vibrio paraheamolyticus</i> (b)	-	VP
<i>Yersinia enterocolitica</i> (c)	-	I1
<i>Brochotrix thermosphacta</i> (d)	+	BT
<i>Listeria monocytogenes</i> (e)/(m)	+	O32/O57
<i>Staphylococcus aureus</i> (d)/(f)	+	M2/SA
<i>Escherichia coli</i> (b)	-	EC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (f)	-	PA
<i>Bacillus subtilis</i> (n)	+	ATCC 6633
<i>Corynebacterium jeikeium</i> (f)	+	CJ

Cepas obtidas de:

- (a) Laboratório de Patologia de Peixes, Universidade Real de Veterinária e Agricultura, Dinamarca.
- (b) Departamento de Microbiologia e Higiene Veterinária, Universidade Real de Veterinária e Agricultura, Dinamarca.
- (c) Laboratório de Alimentação e *Médio ambiente*, Skovlunde, Dinamarca.
- (d) Departamento Biotecnologia, Universidade Técnica de Dinamarca.
- (e) Associação de Alimentação e Bebidas de *Campden*, Chipping Campden, Reino Unido.
- (f) Departamento e Microbiologia Clínica, *Statens Seruminstitut*, Dinamarca
- (g) Knøchel, 1989.
- (h) Gram et al., 1990.
- (j) Jørgensen, 1986.
- (k) Jørgensen y Huss, 1989.

(m) Ben Embarek y Huss 1993.

(n) Chung, Steen y Hansen, 1994.

DETERMINAÇÕES DE IMPEDÂNCIA

Agregaram-se volumes (1,0 ml) de meio de TSB aos recipientes do Bactometer®. Transferiram-se as soluções de protamina (0,1 ml) aos recipientes que depois foram selados, conectaram-se ao Bactometer B123-2 (bioMérieux UK Ltd., UK) e incubou-se a 25°C até se registar um aumento significativo na condutividade eléctrica do meio e registrou-se o tempo de (DT) (máximo 100 h). Normalmente detectam-se quando a concentração celular alcança as 10⁶-10⁷ cfu/ml. Para as cepas Gram-positivas, controlou-se o sinal da capacidade, enquanto que se empregou o câmbio na condução para as cepas Gram-negativas.

EFEITO DA PROTAMINA SOBRE AS CÉLULAS EM CRESCIMENTO

A actividade antibacteriana da protamina sobre as células em crescimento mediu-se nos módulos do Bactometer. Os recipientes (que contêm 1 ml de TSB e 0,1 ml de solução de protamina) foram inoculados com 0,1 ml de um diluição a 10⁻⁴ de um cultivo de inóculo, dando como resultado uma concentração final de células no recipiente de aproximadamente 10³ cfu/ml. A concentração de protamina oscilava entre 1 e 4000 mg/ml dependendo da sensibilidade da cepa submetida ao estudo.

Determinou-se a Concentração de Inibição Mínima (MIC) como a concentração de protamina mais baixa que tinha como resultado a ausência de um DT.

Nos casos em que não se media nenhum DT, se avaliou o efeito letal/inibitório sobre as células colocando em placas o volume total dos recipientes.

EFEITO DA PROTAMINA SOBRE AS CÉLULAS QUE NÃO ESTÃO EM CRESCIMENTO

Inoculou-se 1 ml de inoculo diluindo a 10^{-3} em 250 ml de TSB (aproximadamente 103 cfu/ml) e se incubou a 25°C durante 24 h. Recolheram-se as células por centrifugado (2000*g durante 10 minutos), lavaram-se duas vezes com 0,067 M de tampão de fosfato de sódio estéril com um pH de 7.0 (Weisner 1984) e voltou-se a suspender no mesmo tampão. Ajustou-se a absorvência de 450 nm (OD450) da suspensão bacteriana a 1.0 (aproximadamente 108 cfu/ml), segundo as medições efectuadas com um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 2 (Überlingen, Alemanha). Diluiu-se a suspensão da célula em um tampão de fosfato estéril a concentrações de 105 e 103 cfu/ml. Agregou-se a protamina às suspensões da célula (103, 105 e 108 cfu/ml) em concentrações de 0, 50, 100 e 500 mg/ml e se incubaram as suspensões a 25°C durante 24 h.

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Preparou-se um índice de 10 series de diluições da suspensão de 108 cfu/ml sem protamina agregada. Construiu-se uma curva de calibração em relação a cfu/ml da série de 10 diluições sobre a capacidade ou o DT de condutância em TSB para cada cepa usando um mínimo de 8 passos de diluição.

Duas suspensões tratadas com protamina, inocularam-se 0,1 ml em TSB nos recipientes do Bactometer e se determinou o DT. Este DT foi convertido em um reconto de colónias mediante a curva de calibração. Deste modo, o reconto de colónias não se efectuou directamente sobre as suspensões tratadas com protamina devido a que a protamina causava uma aglutinação significativa das células bacterianas.

Naqueles casos nos que não se mediu nenhum DT, se introduziu o volume total dos recipientes em placas de agar para avaliar se a protamina tinha um efeito bacteriostático ou bactericida.

Resultados

Os valores da MIC determinados a partir da capacidade ou do DT de condutância de células em crescimento em TSB se mostram na Tabela 2.

Tabela 2:

Impedimétrico medido numa concentração de inibição mínima (MIC) como inibição total trás 100 horas a 25°C

Cepa	MIC (µg/ml)
<i>Aeromonas sobria</i>	> 4000
<i>Aeromonas salmonicidae</i>	4000
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3000
<i>Shewanella putrefaciens</i> (4 cepas)	500-1000
<i>Vibrio anguillarum</i>	1000
<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	500-1000
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>4000
<i>Bacillus subtilis</i>	100
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	20
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	100
<i>Listeria monocytogenes</i> (2 cepas)	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> (2 cepas)	500-1000

As cepas Gram-positivas mostraram-se mais sensíveis ante a protamina que as Gram-negativas. Os valores da MIC determinados para as cepas Gram-positivas

oscilavam entre 20 e 1000 µg/ml e variavam de 500 µg/ml a mais de 4000 µg/ml para as cepas Gram-negativas.

A *Brochotrix thermosphacta* foi à cepa mais sensível e uma concentração de protamina de 20 µg/ml de TSB causou a morte total do inoculo (103 cfu/ml), segundo se mede ao colocar em placas o volume dos recipientes trás 100 h de incubação no Bactometer. Uma concentração de protamina de 1000 µg/ml resultou ter um efeito letal do 100% sobre as duas cepas de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (103 cfu/ml). A MIC para a protamina sobre a *S. aureus* foi de 500 µg/ml, ainda que esta concentração não teve um efeito letal.

O DT para a *Aeromonas sóbria* e para a *Yersinia enterocolitica* aumentou com uma concentração de protamina maior, coisa que sugere uma fase de estado latente prolongada. Mas, os cultivos não se inibiram por completo e não se determinou nenhuma MIC. O DT para uma suspensão de 103 cfu/ml de *A. sóbria* foi de 33 h ao incuba-la com 4000 µg/ml comparadas com as 12 h quando não se agregava nenhuma protamina. Para a *Y. enterocolitica* o tempo de para 103 cfu/ml prolongou-se de 21 h a 60 h ao agregá-la 4000 µg/ml de protamina, ver Figura 1. Inibiam-se a *Aeromonas salmonicidae* e a *Pseudomonas fluorescens* com protamina em concentrações de 4000 e 3000 µg/ml de TSB, respectivamente. Deste modo, não se pode observar nenhum câmbio na condutância trás 100 horas de incubação, porém isolaram-se as células vivas dos recipientes. Inibiu-se a *Shewanella putrefaciens* (A2), (A11) e (A22) e a *Vibrio anguillarum* com protamina numa concentração de 1000 µg/ml de TSB e se inibiu a *Vibrio paraheamolyticus* e a *S. putrefaciens* (A6) mediante 500 µg/ml de TSB. A *S. putrefaciens* foi à única bactéria Gram-negativa que se pode matar com a protamina, de maneira que 2000 µg/ml de protamina

acabaram com o 100% do inoculo (103 cfu/ml) das quatro cepas com as que se experimentou.

Ensaaiou-se o efeito bactericida da protamina em células que não estavam em crescimento sobre quatro cepas de *S. putrefaciens* e duas cepas de *L. monocytogenes*. Trás o tratamento com protamina, mediram-se os tempos de detecção e converteram-se num reconto de células usando a curva de calibração gerada para essa cepa em particular (Figura 2). A sensibilidade da *S. putrefaciens* variava dependendo da cepa, ver Tabela 3 abaixo (ver também Tabela 1 para saber o código e a referência de cada cepa). As cepas A2 e A11 se mostraram similares em quanto a sensibilidade e foram mais resistentes que a A6 e a A22. Deste modo, 100 µg de protamina/ml acabaram com as cepas A6 e A22 de *S. putrefaciens* ao suspendê-las em concentrações celulares baixas (105 e 103 cfu/ml). O mesmo nível passou a não ser letal ao 100% para as cepas A2 e A11 de *S. putrefaciens*, ainda que o número de células reduzido em um 90-99.9%.

Calculou-se o número de células inicial medindo a absorvência.

Tabela 3

Número de células bacterianas sobreviventes trás 24 h de tratamento com protamina segundo se estimou com as curvas de calibração da capacitância/condutância.

Bactéria	Código	Número inicial de células (cfu/ml)	Número estimado de células depois de 24 h de tratamento com protamina em 4 concentrações de protamina (µm/ml)		
			0	100	500



<i>S.</i> <i>Putrefacie</i> <i>ns</i>	A2	10^8	$6 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^6$
		10^5	$8 \cdot 10^6$	$\sim 1^c$	$\sim 1^c$
		10^3	$1 \cdot 10^4$	$\sim 1^c$	$\sim 1^c$
-	A6	10^8	$1 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$
		10^5	$8 \cdot 10^4$	K	K
		10^3	$3 \cdot 10^3$	K	K
-	A11	10^8	$5 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^2$
		10^5	$2 \cdot 10^6$	3	1
		10^3	$3 \cdot 10^2$	$\sim 1^c$	$\sim 1^c$
-	A22	10^8	$6 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$	
		10^5	$6 \cdot 10^4$	K	K
		10^3	$3 \cdot 10^3$	K	K
<i>Listeria</i> <i>Monocyto-</i> <i>genes</i>	O32	10^8	$9 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^6$
		10^5	$8 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$
		10^3	$2 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$
	O57	10^8	$3 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
		10^5	$1 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^5$
		10^3	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^2$

k: Nenhuma célula sobrevivente (determinado dispersando em placas o meio dos recipientes).

c): Tempo de (DT) prolongado correspondente a um número de células muito baixo (aproximadamente 1 célula sobrevivente).

A protamina a 100 e 500 $\mu\text{g/ml}$ não teve nenhum efeito sobre células de *L. monocytogenes* que não estão em crescimento e, ao aumentar a concentração de protamina a 1000 $\mu\text{g/ml}$, não deu como resultado nenhum efeito letal da protamina sobre a *L. monocytogenes* que não estava em crescimento.

Os resultados mostram que a salmina (protamina do salmão) em concentrações de 100-4000 $\mu\text{g/ml}$ prolongaram significativamente a fase de estado latente de varias bactérias Gram-negativas. A protamina passou a ser mais eficaz sobre as células da *L. monocytogenes* em crescimento activo em comparação com as células suspensas no tampão. Pode-se observar o efeito bactericida da protamina sobre a *Shewanella putrefaciens* tanto sobre as células em crescimento como sobre as que não estavam em crescimento. Foi necessária uma concentração de protamina de 2000 $\mu\text{g/ml}$ para acabar com a *S. putrefaciens* em crescimento (103 cfu/ml), enquanto que se pode matar as células que não estavam em crescimento com só 50 $\mu\text{g/ml}$. Quando a concentração celular aumentava, o efeito bactericida da protamina decrescia, provavelmente devido a uma maior proporção de célula/protamina.

O método impedimétrico usado neste estudo resultou ser útil para medir a actividade antibacteriana de uma proteína catiônica que causava uma aglutinação celular. Surgem excelentes correlações entre o tempo de Y o cfu das células não submetidas ao tratamento, ver Figura 2. A correlação entre as células tratadas com protamina Y o cfu resultou ser estatisticamente similar a correlação para as células não submetidas o tratamento (dados não mostrados). Mas, ao colocar em placas as células tratadas com protamina tinham como resultado um amplo grau de variação sobre o reconto de células.

Demonstrou-se que a protamina inibe o crescimento de todas as cepas avaliadas, coisa que vem determinada bem o modo de fase de estado latente prolongada para as bactérias mais resistentes, bem o modo de efeito letal em algumas das cepas submetidas a investigação, as bactérias Gram-positivas em particular. O facto de que a protamina se dê naturalmente e que não seja tóxica faz que possa ser considerada uma proteína antibacteriana que poderia prometer bastante em quanto ao controle de, por exemplo, a destruição de bactérias e agentes patógenos procedentes dos alimentos.

EXEMPLO 2

Comparação de concentrações de inibição mínima para as enzimas e proteínas básicas

Determinou-se a concentração mínima de inibição (MIC) de diferentes substâncias segundo se descreve no exemplo 1.

Ensaíram-se as seguintes substâncias: a protamina (A), o sulfato de protamina (B), um sistema de enzimas de peroxidase (ou seja, lactoperoxidase/glucosaoxidase (C)), a subtilisina (D), a poliarginina (E) com um peso molecular médio de aproximadamente 6 kD e a lisozima (F) (150 000 unidades/mg; Johansen, C. et al., 1994). Os resultados se mostram na Tabela 4 que aparece abaixo.

Demonstrou-se que a protamina e o sulfato de protamina são substâncias muito eficazes para inibir todas as cepas submetidas a exame, enquanto que a poliarginina é eficaz para inibir todas as cepas salvo a *Pseudomonas spp.* à parte do efeito da lisozima sobre a *Listeria monocytogenes*, nenhuma das enzimas submetidas ao exame produziu efeito.

Tabela 4:

Concentrações de inibição mínima comparativas

Sustância Cepa	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)					
	A	B	C	D	E	F
<i>Listeria monocytogenes</i>	1000	1000	n. e.	n. e.	2000	2000
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	2000	n. e.	n. e.	1500	n. e.
<i>Escherichia coli</i>	1000	n. d.	n. e.	n. e.	1500	n. e.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4000	n. d.	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3000	4000	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1000	500	n. e.	n. e.	1500	n. e.
<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	1000	500	n. e.	n. e.	2000	n. e.

n.d.: não realizado

n.e.: não eficaz

* O sistema de *lactoperoxidase* foi eficaz durante um máximo de 70 horas. A definição da MIC requer uma inibição de ao menos 100 horas.

EXEMPLO 3

A influência do pH e a concentração celular sobre o efeito antibacteriano da protamina

Avaliou-se a influência do pH sobre o efeito antibacteriano da protamina mediante os materiais e os métodos descritos no exemplo 1.

Os resultados mostram-se na figura 3 e demonstram claramente que o efeito antibacteriano da protamina depende na sua maior parte do pH. Quando se dá pH baixo, a protamina (1 mg/ml) não possui nenhum efeito sobre a bactéria

Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, ainda que naqueles casos nos que o pH é alto, a protamina (1 mg/ml) prolongava o tempo de 32 a 71 horas. Observou-se a interação entre o pH e a protamina em todas as cepas submetidas a exame.

E mais, avaliou-se a influência da concentração celular sobre o efeito antibacteriano da protamina mediante os materiais e métodos descritos no exemplo 1, ou seja, se mediu por valorização impedimétrica a correlação entre a concentração celular e a concentração de protamina.

Os resultados mostram-se na figura 4 e na figura 5 e demonstram claramente que se observou um efeito sinérgico significativo entre a concentração celular e a concentração de protamina. Deste modo, quando se dá uma concentração celular baixa, a protamina (1 mg/ml) causa uma prolongação do tempo de detenção 12 a por encima das 100 horas para a bactéria Gram-negativa *Shewanella putrefaciens* (4 cepas), em comparação com uma prolongação quando se dá uma alta concentração celular de 6 a 18 horas. O tempo detenção para a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* (2 cepas) se prolongou, com uma concentração celular baixa, de 18 a 55 horas ao tratá-la com protamina (1 mg/ml), enquanto que com uma concentração celular alta a mesma concentração de protamina só prolongou o tempo de 4 a 15 horas.

EXEMPLO 4

Efeito antimicrobiano sinérgico entre uma proteína básica, uma enzima que degrada a parede celular e um sistema de enzimas de peroxidase

As medições impedimétricas levadas a cabo segundo se descrevem no exemplo 1 mostraram um efeito sinérgico entre os peptídeos básicos como a protamina, a poliarginina ou a polilisina e a lisozima e/ou glicose-oxidase e/ou

o sistema de enzima lactoperoxidase dependendo do pH e a concentração de NaCl.

Levou-se a cabo experiências de inibição do crescimento nos que se dão os efeitos sinérgicos e adicionais ao misturar compostos em concentrações baixas que não apresentavam nenhum tipo de actividade por si mesmos e usando um desenho factorial. Mediram-se os efeitos como inibição do crescimento ou um efeito bactericida ao 100% com uma exterminação total do inoculo.

A protamina (250 µg/ml) ou a polilisina (500 µg/ml) em combinação com a lactoperoxidase (2 U/ml) e a glicose-oxidase (2 U/ml) tiveram um efeito letal do 100% sobre a *Pseudomonas fluorescens*, enquanto que a mesma cepa não se vê inibida ao trata-la com qualquer destes três compostos por separado nas concentrações mencionadas anteriormente.

Observou-se um efeito sinérgico contra a *Pseudomonas fluorescens* ao combinar a protamina (250 µg/ml) e a poli (500 µg/ml) e a lisozima (50000 U/ml) e a lactoperoxidase (2 U/ml) e a glicose-oxidase (1 U/ml) ou a lisozima (50.000 U/ml) e a polilisina (500 µg/ml) e a lactoperoxidase (2 U/ml) e a glicose-oxidase (1 U/ml).

As experiências em que se mediu o efeito antibacteriano como inibição do crescimento da *Shewanella putrefaciens* em TSB a 25°C e com um pH de 7.2, mostraram um efeito sinérgico entre a protamina e a lisozima; os resultados aparecem na figura 6 o modo de plano de superfície de resposta. A lisozima por si só não tinha nenhum efeito sobre a bactéria Gram-negativa *Shewanella putrefaciens* assim como também o teve a protamina a concentrações inferiores a 500 µg/ml, enquanto que as combinações causaram uma actividade

bactericida do 100% a concentrações de protamina por encima de 300 µg/ml e a concentrações de lisozima de 104-106 U/ml (actividade do lisozima: 150000 U/mg).

EXEMPLO 5

Actividades fungistáticas e fungicidas

Esta experiência efectuou-se segundo se descreve no exemplo 1 mediante o substrato de Bactometer: 0,75 g de extracto de levedura (Difco), 3,0 g de D(+) Glicose, 1 g de KH₂PO₄, 0,8 g de isogel de agarosa IEF (Pharmacia) e 100 ml de água destilada.

Agregou-se imediatamente a protamina ao substrato antes que tivera lugar a inoculação com uma suspensão de esporas de fungos submetidos ao exame (aproximadamente 10³-10⁴ cfu/ml).

Determinou-se a concentração inibitória mínima como a concentração mínima de protamina que pudera ter como resultado uma ausência de DT durante as 100 h de medição (ver Tabela 5, abaixo). Nos casos em que não se determinou nenhum DT, se calculou uma actividade fungicida ao colocar em placas a diluição do volume total dos recipientes.

Tabela 5

Cepa	pH	MIC (µg/ml)
<i>Alternaria infectoria</i>	5.2	240
<i>Aspergillus niger</i>	7.1	1000
<i>Botrytis aclada</i>	5.2	120
<i>Cladosporium herbarum</i>	5.2	120
<i>Eurotium repens</i>	5.2	240
<i>Fusarium culmorum</i>	5.2	240



<i>Penicillium comcam</i>	6.1	1000
<i>Penicillium crustosum</i>	6.2	1000
<i>Penicillium roqueforti</i>	5.2	240
<i>Ulocladium atrum</i>	5.2	240

O efeito fungistático e fungicida da protamina foi ótima quando se dava um pH alto e, o tamanho do inoculo era pequeno, como efeito sobre as bactérias.

Ao aumentar o pH se causava um decrescimento significativo no valor da MIC. Obteve-se um efeito fungistático com uma concentração de protamina 2-5 vezes inferior que a que se empregava quando se determinava um efeito fungicida. As cepas mais resistentes mostradas na Tabela 5 não se inibiram mediante a protamina durante 100 h a um pH baixo, de modo que não se obteve uma inibição de 100 h antes de aumentar o pH aos valores dados na Tabela.

EXEMPLO 6

Sobrevivência e deslocamento das bactérias durante o minilavado

Materiais:

Ariel Cor (DF-9412330).

Amostras (algodão branco, DF-9415585), esterilizadas mediante autoclavização.

Caldo de soja de tripton (TSB).

Água esterilizada (12° dH).

Cepas:

Staphylococcus aureus (isolado da pele)

Pseudomonas aeruginosa (isolado da pele)

Métodos:

Inoculo:

Deixou-se crescer a *S. aureus* e a *P. aeruginosa* num caldo de soja de tripton (TSB) a 25°C durante 30 horas. Para cada cepa, inocularam-se seis amostras estéreis com aproximadamente 10⁶ cfu/mostra e secaram-se por ar durante 30 minutos.

Minilavado:

Dissolveram-se 0,56 g de Ariel Cor em 80 ml de água estéril (12° dH, 35°C) em cada copo de precipitados, para o lavado, dando como resultado a concentração final de 7 g/l. Agregou-se a protamina, dissolvida em água e esterilizada mediante filtros a metade dos copos de precipitados, para o lavado, dando como resultado a concentração final de 500 µg/ml.

Trás 70 seg. transferiram-se 1 amostra inoculada e 2 amostras estéreis a cada copo de precipitados, para o lavado e lavaram-se a 35°C durante 15 minutos. Lavaram-se 3 amostras estéreis num copo de precipitados, o modo de controle.

De cada copo de precipitados, para o lavado transferiram-se 0,1 ml de solução detergente a um sistema Maltus (células indirectas) que continha TSB e incubaram-se.

Enxaguaram-se as amostras em água estéril durante 10 minutos (agitando-as). De cada copo de precipitados, incubaram-se 0,1 ml de água destinada ao lavado em um sistema Maltus (células indirectas).

Trás o lavado, secaram-se ao ar todas as amostras ligeiramente em ar estéril durante 10 minutos e transferiu-se cada amostra a uma célula indirecta do sistema Maltus.

Esterilizaram-se todos os materiais e instrumentos salvo o detergente antes do seu uso para evitar que se produzisse uma contaminação.

Maltus indirecto:

Utilizaram-se as medições efectuadas com o sistema Maltus indirecto para calcular o número de células viáveis.

Transferiam-se 3 ml de TSB a câmara externa das células do sistema Maltus indirecto e transferiram-se 0,5 ml de KOH estéril (0,1 M) a câmara interior. Como as células crescem na câmara externa, produzem CO₂ (g) que faz que o KOH se dissolva na câmara interior e, desse modo, muda a condutância do KOH. Nos casos em que o câmbio na condutância se pode medir com o sistema Maltus, anota-se o tempo de detenção (DT). Converteu-se o DT em um reconto de colónias mediante uma curva de calibração na que relacionava o cfu/ml com o DT (ver figuras 1 e 2).

Preparou-se um índice de uma série de 10 diluições da suspensão de células de 10⁸ cfu/ml. A DT de condução de cada passo da diluição se determinou no TSB e construiu-se uma curva de calibração que relacionava o cfu/ml das 10 diluições com o DT no TSB para cada cepa (ver figuras 1 e 2).

Resultados:

O número de células que sobreviveram ao minilavado, na solução detergente, unidas às mostras contaminadas, transferidas à água de enxágue ou às mostras estéreis, foi determinado mediante o sistema Maltus indirecto (Tabela 6).

Extraíu-se mediante o lavado um número relativamente alto de células das amostras e estas encontraram-se na água de enxágue, ainda que aproximadamente 10³ cfu seguiam unidas às mostras depois do minilavado, e enxaguaram-se durante 10 minutos e, durante o lavado, transferiram-se as células da amostra contaminada às amostras estéreis. Descobriu-se que as células da *S. aureus* se mostravam muito sensíveis ante a protamina, facto que pode vir explicado pela actividade antibacteriana incrementada da protamina quando se dá um pH alto. Determinou-se um número elevado de células *P. aeruginosa* na solução detergente e se descobriu que a protamina se mostrava activa ante as

células na solução detergente. Mas, não se inibiram ou mataram as células de *P. aeruginosa* unidas às mostras mediante a protamina e se contaminaram todas as mostras estéreis nos lavados inoculados com *P. aeruginosa* durante o lavado.

A água destinada ao lavado era quase estéril, de modo que as células puderam aderir activamente ao têxtil.

Tabela 6:

Número de células na solução detergente, a água de enxágue, unidas às mostras contaminadas e transferidas às mostras estéreis, antes e depois do minilavado a 35°C durante 15 minutos com Ariel Cor. Efectuaram-se cada lavado por triplicado, A, B e C são os três copos de precipitados, para o lavado com as mesmas combinações de cepa e protamina.

	<i>Staphylococcus aureus</i> (µg/ml)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/ml)	
	0	500	0	500
Antes do lavado (cfu/mostra)				
mostra contaminada				
A	1,6*10 ⁶	1,6*10 ⁶	4,0*10 ⁶	4,0*10 ⁶
B	1,6*10 ⁶	1,6*10 ⁶	4,0*10 ⁶	4,0*10 ⁶
C	1,6*10 ⁶	1,6*10 ⁶	4,0*10 ⁶	4,0*10 ⁶
mostra estéril 1				
A	0	0	0	0
B	0	0	0	0
C	0	0	0	0
mostra estéril 2				
A	0	0	0	0
B	0	0	0	0
C	0	0	0	0



Depois do minilavado (cfu/mostra)				
mostra contaminada				
A	$1,7 \cdot 10^3$	0	$8,0 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^1$
B	$3,0 \cdot 10^3$	0	$1,2 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10^1$
C	$2,9 \cdot 10^2$	0	$6,0 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^1$
mostra 1				
A	1	0	$4,0 \cdot 10^2$	1
B	0	0	$5,0 \cdot 10^1$	1
C	$2,8 \cdot 10^2$	0	1	1
mostra 2				
A	$6,1 \cdot 10^2$	0	$7,0 \cdot 10^2$	1
B	1	0	1	1
C	0	0	$3,0 \cdot 10^1$	1
Solução detergente (cfu/ml)				
Volume total; 80 ml				
A	$2,0 \cdot 10^3$	1	- (a)	0
B	$6,3 \cdot 10^3$	0	$5,8 \cdot 10^5$	0
C	$2,0 \cdot 10^3$	0	$1,9 \cdot 10^4$	0
Água de enxágue (cfu/ml)				
Volume total; 80 ml				
A	0	0	0	1
B	0	0	0	1
C	0	0	1	0

(a): Nenhum DT determinado mediante o sistema Maltus, observou-se o crescimento nas células do sistema Maltus a olho.

A partir dos resultados pode-se concluir que Ariel Cor não possui nenhum efeito bactericida de importância sobre a *S. aureus* e a *P. aeruginosa* (isolados patógenos da pele).

Lavou-se um amplo número de células das mostras e as achou na solução detergente e, nos casos em que não se agregou nenhuma protamina, as células

da mostra inoculada contaminaram as mostras estéreis no copo de precipitados, para o lavado.

REFERENCIAS

Ben Embarek, P. K. & Huss, H. H. 1993 Heat resistance of Listeria monocytogenes in vacuum packaged pasteurized fish fillets. *International Journal of Food Microbiology* **20**, 85-95.

Bierbaum, G. & Sahl, H. G. 1987 Autolytic system of Staphylococcus simulans 22: Influence of cationic peptides on activity of n-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *Journal of Bacteriology* **169**, 5452-5458.

Bierbaum, G. & Sahl, H. G. 1991 Induction of autolysis of Staphylococcus simulans 22 by Pep5 and nisin and influence of the cationic peptides on the activity of the autolytic enzymes. In *Nisin and novel antibiotics* ed. Jung, G. & Sahl, H. G, p. 347-358. ESCOM, Leiden.

Brange, J. 1987 *Galenics of insulin*. Ch. 3, pp. 34-36. Berlin: Springer-Verlag.

Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R. B. & Mauzerall, D. 1988 Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5072-5076.

Chung, Steen & Hansen, (1994). Subtilisin gene of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 is incoded in an operon that contains homologues of the hemolysin B transport protein, *J. Bact.*, Vol. 174 (1994), p. 1414-1422.

Connolly, P., Bloomfield, S. F. & Denyer, S. P. 1993 A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 456-462.

Farrag, S. A. & Marth, E. H. 1992 Escherichia coli 0157:H7, Yersinia enterocolitica and their control in milk by the lactoperoxidase system: a review. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **25**, 201-211.

- Firstenberg-Eden, R. & Eden, G. 1984 *Impedance microbiology*. Letchworth: John Wiley & Sons Inc.
- Gram, L., Wedell-Nedergaard, C. & Huss, H. H. 1990 The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (Lates niloticus). *International Journal of Food Microbiology* **10**, 303-316.
- Hitsch, J. G. 1958 Bactericidal action of histone. *Journal of experimental medicine* **108**, 925-944.
- Horrow, J. C. 1985 Protamine: A review of its toxicity. *Anaesthesia Analgesia* **64**, 51-55.
- Hugo, W. B. 1978 Membrane-active antimicrobial drugs - a reappraisal of their mode of action in the light of the chemosmotic theory. *International Journal of Pharmaceutics* **1**, 127-131.
- Islam, N. MD., Itakura, T. & Motohiro, T. 1984 Antibacterial spectra and minimum inhibition concentration of clupeine and salmine. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **50**, 1705-1708.
- Jaques, L. B. 1973 Protamine - antagonist to heparin. *Canadian Medical Association Journal* **108**, 1291-1297.
- Jeong, D. K., Harrison, M. A., Frank, J. F. & Wicker, L. 1992 Trials on the antibacterial effect of glicose oxidase on chicken breast skin and muscle. *Journal of Food safety* **13**, 43-49.
- Jeppesen, V. F. & Huss, H. H. 1993 Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. *International Journal of Food Microbiology* **18**, 305-320.
- Johansen, C., Gram, L. & Meyer, A. S. 1994 The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on the growth of Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*, in press.
- Jørgensen, B. R. 1986 Sorbic acid - effect on fish - influence of pH on the effect. Mastersthesis (en danés). Technological Laboratory, Danish Ministry of Fisheries, Technological University of Denmark.

Jørgensen, B. R. & Huss, H. H. 1989 Growth and activity of Shewanella putrefaciens isolated from spoiling fish. *International Journal of Food Microbiology* **9**, 51-62.

Kagan, B. L., Selsted, m. E., Ganz, T. & Lehrer, R. I. 1990 Antimicrobial defensin peptides from voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 210-214.

Knøchel, S. 1989 Aeromonas spp. - ecology and significance in food and water hygiene. Ph.D. thesis. Technological Laboratory and the Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Dinamarca.

Kossel, A. 1928 The protamines and histones, Longmans, Green and Co., Londres, Nueva York, Toronto, 1-63.

Lehrer, R. I., Lichtentstein, A. K. & Ganz, T. 1993 Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of animal cells. *Annual Review of Immunology* **11**, 105-128.

Nakae, T. 1985 Outer-membrane permeability of bacteria. In *Critical Reviews in Microbiology* ed. O'Leary, W. M., pp. 1-62. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Phillips, L. G., Yang, S. T., Schulman, W. & Kinsella, J. E. 1989 Effect of lysozyme, clupeine, and sucrose on the foaming properties of whey protein isolate and β -lactoglobulin. *Journal of Food Science* **54**, 743-747.

Rodman, T. C., Pruslin, F. H. & Allfrey, V. G. 1984 Protamine-DNA association in mammalian Spermatozoa. *Experimental Cell Research* **150**, 269-281.

Sahl, H. G. 1987 Influence of the staphylococci-like peptide Pep5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* **162**, 833-836.

Trevors, J. T. 1986 Bacterial growth and activity as indicators of toxicity. In *Toxicity testing using microorganisms* ed. Bitton, G. & Dutka, B. J. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Vaara, M. 1992 Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* **56**, 395-411.

Vaara, M. & Vaara, T. 1983 Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **24**, 114-122.

Weisner, B. 1984 Lysozyme (muramidase). In *Methods of Enzymatic Analysis* Vol. 4, ed. Bergmeyer, H. U. págs. 189-195.

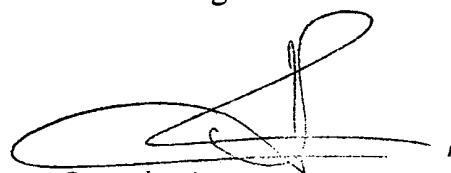
Weinheim: Verlag Chemie.

Yanagimoto, T., Tanaka, M. & Nagashima, Y. 1992 Changes in the antibacterial activity of salmine during Its Maillard reaction. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **58**, 2153-2158.

Lisboa, 20 de Março de 2001.

Pela Requerente

O Agente Oficial



Gonçalo da Cunha Ferreira

Adjunto do Agente Oficial da
Propriedade Industrial

R. D. João V, 9-2.º dt.º - 1250 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Composição bactericida, bacteriostática, fungicida e/ou fungistática caracterizada por incluir ou compor-se essencialmente de uma proteína básica seleccionada do grupo consistente em protaminas, sulfatos de protamina, defensinas, magaininas, melittina, cecropinas e protegrinas ou um peptídico básico seleccionado entre o grupo consistente em polilisinas e poliargininas e copolímeros derivados capazes de matar células microbianas em combinação com uma oxidorreductase.
2. Composição segundo a reivindicação 1 caracterizada por compreender além disso um enzima que degrada a parede celular capaz de degradar o peptidoglicano, a quitina e/ou o ácido teicoico, preferentemente seleccionada do grupo consistente nas endoglicosidase Tipo II, as lisozimas e as quitinase.
3. Composição segundo a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por a proteína básica possuir uma sequência de aminoácidos consistente em aminoácidos que se dão normalmente em células mamíferas.
4. Composição segundo qualquer das reivindicações 1-3, caracterizada por a proteína básica ser de origem biológica ou microbiológica.
5. Composição segundo qualquer das reivindicações 1-4, caracterizada por a proteína básica ser recuperada a partir de material biológico.
6. Composição segundo qualquer das reivindicações 1-4, caracterizada por a proteína básica ser uma proteína recombinante.

7. Composição segundo qualquer das reivindicações 1-6, caracterizada por a oxidoreductase ser seleccionada do grupo consistente em oxidase (EC 1.10.3) e peroxidase (EC 1.11.1), preferentemente de sistemas de enzima peroxidase (EC 1.11.1.7) e enzima lacase (EC 1.10.3.2).

8. Composição segundo qualquer das reivindicações 1-7, caracterizada por o sistema de enzimas de peroxidase compreender, como mínimo, um enzima peroxidase e um sistema de enzimas que gera peróxido de hidrogénio tal como uma oxidase e um substrato para a oxidase ou uma aminoácidoxidase e um aminoácido adequado, ou um ácido peroxicarboxílico ou um sal derivado.

9. Composição de limpeza ou de detergente caracterizado por incluir uma proteína básica seleccionada do grupo consistente em protaminas, sulfatos de protamina, defensinas, magaininas, melittina, cecropinas e protegrinas ou um peptídeo básico seleccionado do grupo consistente em polilisinas e poliargininas e copolímeros derivados capazes de matar células microbianas, uma oxidoreductase, um surfactivo e, opcionalmente, uma enzima que degrada a parede celular microbianas capaz de degradar o peptidoglucano, a quitina e/ou o ácido teicoico.

10. Composição segundo a reivindicação 9, caracterizada por a proteína básica ter uma sequência de aminoácidos consistente em aminoácidos que se dão normalmente nas células de mamíferos.

11. Composição segundo qualquer das reivindicações 9-10, caracterizada por o enzima que degrada a parede celular ser seleccionada do grupo consistente em endoglicosidase Tipo II e muramidase como podem ser os lisozimas e as

quitinase; e/ou a oxidorreductase é seleccionada dos sistemas de enzimas de peroxidase (EC 1.11.1.7) e as enzimas lacase (EC 1.10.3.2).

12. Composição segundo qualquer das reivindicações 9-11, caracterizada por o sistema de peroxidase compreender, como mínimo, uma enzima derivada da peroxidase e um sistema de enzimas que gera peróxido de hidrogénio tal como uma oxidase e um substrato para a oxidase ou uma aminoácidoxidase e um aminoácido adequado, ou um ácido peroxicarboxílico ou um sal derivado.

13. Composição segundo qualquer das reivindicações 9-12, caracterizada por, além disso, compreender, como mínimo, uma enzima seleccionada do grupo consistente em protease, amilase, celulase e lipase.

14. Composição segundo qualquer das reivindicações 9-13, caracterizada por o surfactivo ser um surfactivo detergente, preferentemente seleccionado dentre o grupo consistente em surfactivo aniônicos, não iônicos, anfóteros, de íons bipolares e catiónicos.

15. Composição segundo qualquer das reivindicações 9-14, caracterizada por a proteína básica ser uma protamina ou um sulfato de protamina numa quantidade que é eficaz para matar células ou inibir o crescimento das células, preferentemente numa quantidade que oscile entre 1 e 4000 mg por l de solução de limpeza ou de solução de lavado, mais preferentemente entre 1 e 2000 mg por l de solução de limpeza ou de solução de lavado, especialmente entre 5 e 1000 mg por l de solução de limpeza ou de solução de lavado.

16. Método para matar células microbianas presentes numa superfície dura caracterizado por a superfície entrar em contacto com uma composição de limpeza produzida segundo qualquer das reivindicações 9-15 ou uma composição segundo qualquer das reivindicações 1-8, preferentemente uma composição que inclua uma protamina ou um sulfato de protamina.

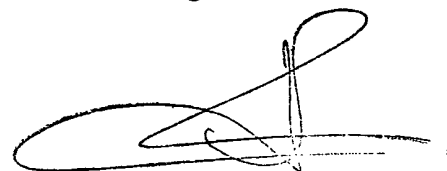
17. Método para matar células microbianas ou para inibir o crescimento das células microbianas presentes na filtração caracterizado por a filtração entrar em contacto com uma composição de detergentes segundo qualquer das reivindicações 9-15 ou uma composição segundo qualquer das reivindicações 1-8, preferentemente uma composição que inclua uma protamina ou um sulfato de protamina.

18. Método para a conservação de alimentos, bebidas, cosméticos, produtos para as lentes de contacto, ingredientes de alimentos ou composições de enzimas caracterizado por incluir a incorporação nos alimentos, bebidas, cosméticos, produtos para as lentes de contacto, ingredientes de alimentos ou composições de enzimas sem conservantes uma proteína básica seleccionada entre o grupo consistente em protaminas, sulfatos de protamina, defensinas, magaininas, melittina, cecropinas e protegrinas ou um peptídico básico seleccionado entre o grupo consistente em polilisinas e poliargininas e copolímeros derivados ou uma composição segundo qualquer das reivindicações 1-8 numa quantidade que seja eficaz para inibir o crescimento de células microbianas, preferentemente uma protamina ou um sulfato de protamina ou uma composição que inclui uma protamina ou um sulfato de protamina.

19. Uso de uma composição segundo qualquer das reivindicações 1-8 ou uma composição de limpeza segundo qualquer das reivindicações 9-15 para preparar um desinfectante que seja útil para matar células microbianas presentes na pele humana ou animal, membranas mucosas, feridas, machucados ou nos olhos caracterizado por incluir uma proteína básica seleccionada entre o grupo consistente em protaminas, sulfatos de protamina, defensinas, magaininas, melittina, cecropinas e protegrinas ou um peptídico básico seleccionado entre o grupo consistente em polilisinas e poliargininas e copolímeros derivados em uma quantidade que seja eficaz para matar células, preferentemente uma protamina ou sulfato de protamina, ou uma composição segundo qualquer das reivindicações 1-8 ou 9-15.

Lisboa, 20 de Março de 2001.

Pela Requerente
O Agente Oficial



Gonçalo da Cunha Ferreira
Adjunto do Agente Oficial da
Propriedade Industrial
R. D. João V, 9-2º dt.º - 1250 LISBOA

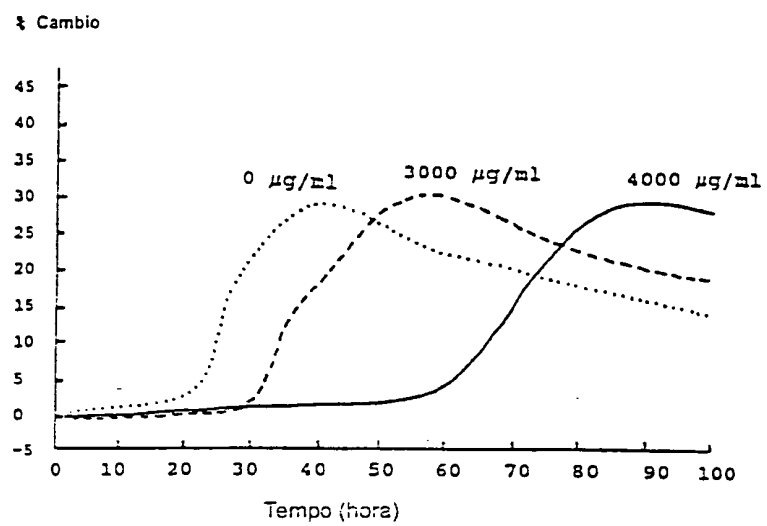


FIG. 1

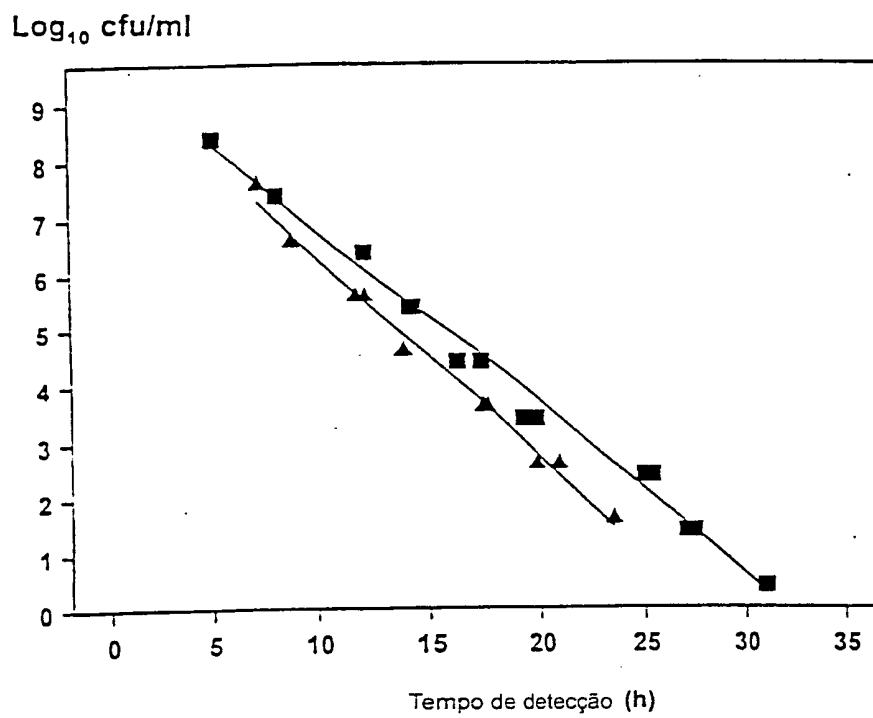


FIG. 2

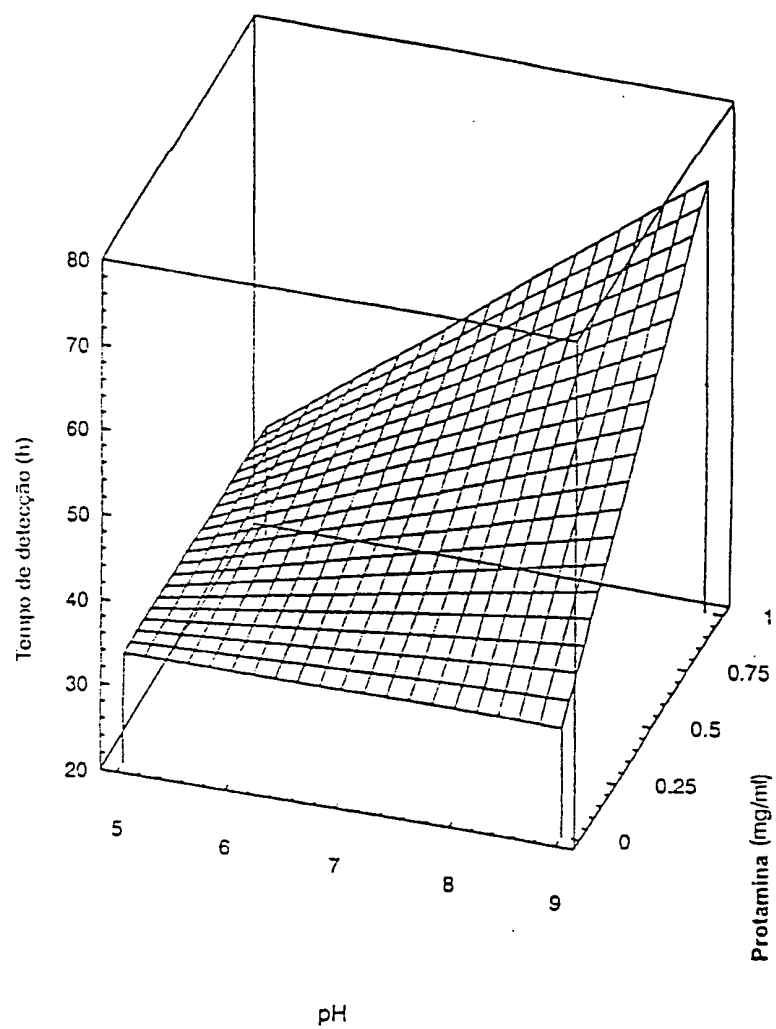


FIG. 3

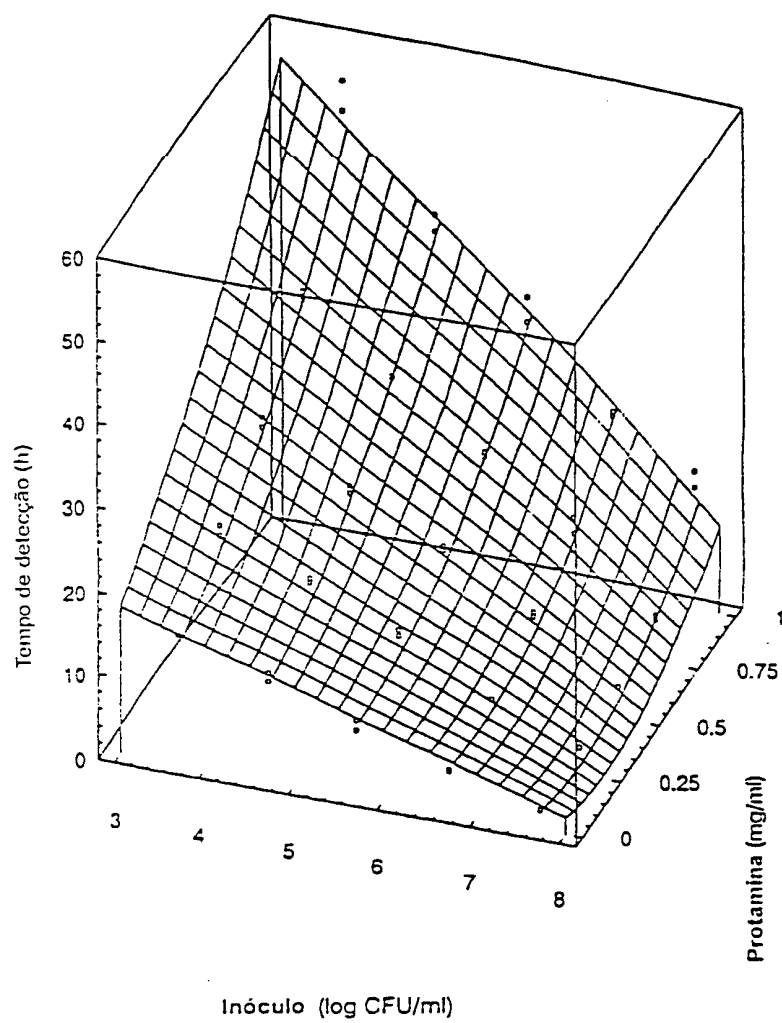


FIG. 4

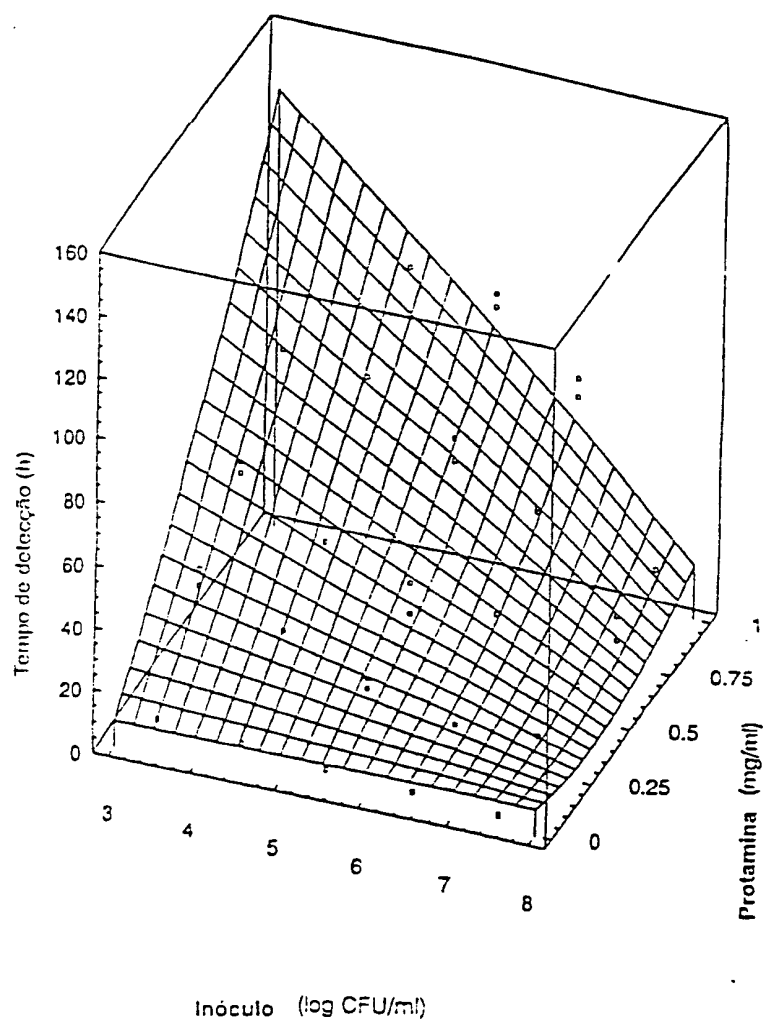


FIG. 5

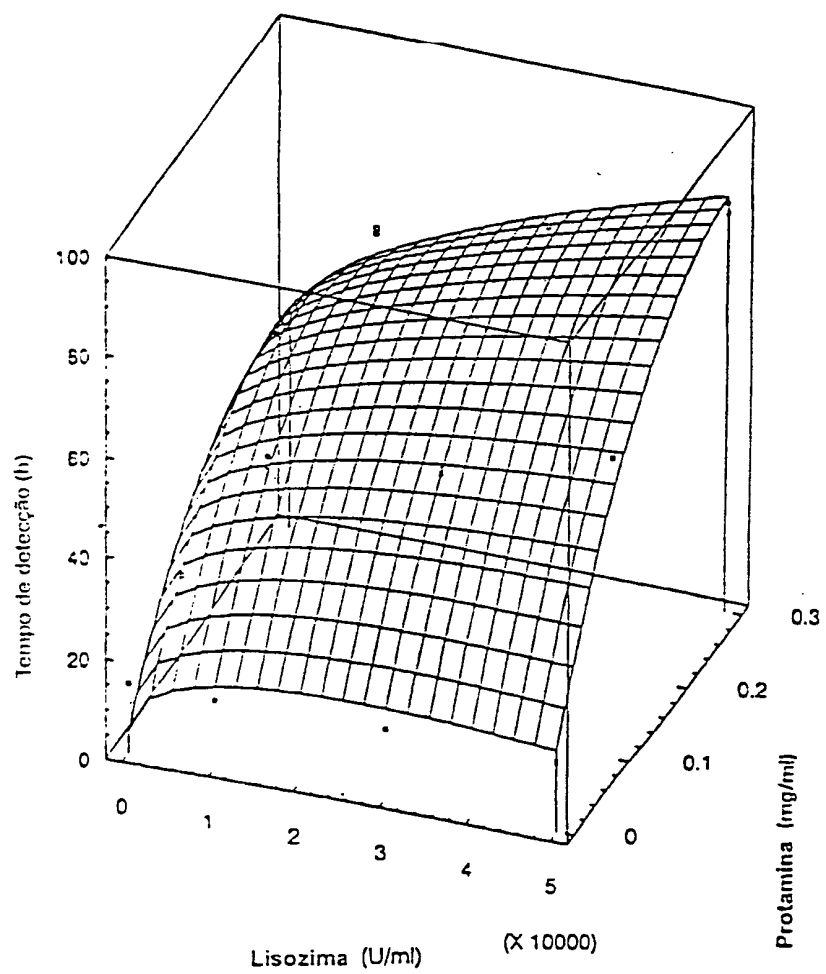


FIG. 6