



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

(21) **PI0613337-1 A2**

(22) Data de Depósito: 13/06/2006
(43) Data da Publicação: 04/01/2011
(RPI 2087)



(51) *Int.Cl.:*
A01N 63/02
A01N 59/00
A01N 59/24
A01P 1/00

(54) Título: **MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, MÉTODO PARA MATAR OU INIBIR O CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO**

(30) Prioridade Unionista: 15/06/2005 US 11/153,571

(73) Titular(es): Buckman Laboratories International, Inc.

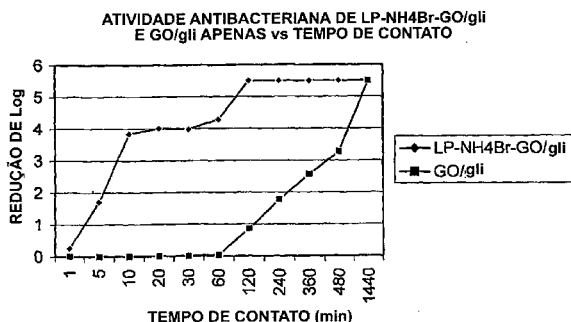
(72) Inventor(es): Stephen D. Bryant, Thomas E. Mcneel,
Xiangdong Zhou

(74) Procurador(es): ANTONIO MAURICIO PEDRAS
ARNAUD

(86) Pedido Internacional: PCT US2006022928 de 13/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/138271 de 28/12/2006

(57) Resumo: MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, METODO PARA MATAR OU INIBIR O CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, COMPOSIÇÃO E METODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO. Um método e composição para matar, prevenir, ou inibir o crescimento de microorganismos em um sistema aquoso ou em um substrato capaz de suportar um crescimento de microorganismos são providos através da provisão de uma lactoperoxidase, peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido, um haleto, outro que não cloreto, ou um tiocianato e, opcionalmente, uma fonte de amônio, sob condições nas quais a lactoperoxidase, o peróxido obtido de peróxido de hidrogênio ou de uma fonte de peróxido, haleto ou tiocianato e amônio obtido de uma fonte de amônio interagem para prover um agente antimicrobiano para o sistema aquoso ou para o substrato.





PI0613337-1

"MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, MÉTODO PARA MATAR OU INIBIR O CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO".

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a composições e métodos para controlar o crescimento de microorganismos em sistemas aquosos ou em substratos tais como um ou mais superfícies de um substrato. A presente invenção também se refere à formação de um agente antimicrobiano através da interação de lactoperoxidase com outros componentes.

Histórico da invenção

As peroxidases são um grupo de enzimas amplamente distribuídas na natureza. Sua função primária, na natureza, é catalizar as reações de oxidação enquanto consomem peróxido de hidrogênio ou outro agente oxidativo. Um doador de elétron (agente redutor) é geralmente requerido para que a reação de oxidação seja avançada.

A peroxidase em presença de peróxido de hidrogênio e em presença de haletos ou tiocianatos como doadores de elétrons pode gerar produtos que possuam um amplo alcance de propriedades antimicrobianas. A peroxidase pode variar com relação aos haletos particulares ou tiocianatos com os quais ela pode reagir. Por exemplo, mieloperoxidase utiliza Cl^- , Br^- , I^- ou SCN^- como os doadores de elétrons, e os oxida para formar hipohaletos antimicrobianos ou hipotiocianatos. As lactoperoxidasas catalisam a oxidação de Br^- , I^- ou SCN^- , mas não de Cl^- , para produzir produtos antimicrobianos. A peroxidase do rábano silvestre ("Horseradish") usa apenas I^- como doador de elétron para resultar em I_2 , HIO , e IO^- . As áreas de aplicação onde os sistemas peroxidase-haleta- H_2O_2 antimicrobiano foram usados incluem, alimentos, fábrica de laticínios, cuidados pessoais, e produtos

veterinários.

A patente norte-americana No. US 5,451,402 para Allen descreve um método para matar leveduras e microorganismos esporulados com composições contendo haloperoxidasas, as
5 quais são úteis no tratamento anti-séptico terapêuticos de indivíduos humanos ou animais e aplicações *in vitro* para desinfecção ou esterilização de microorganismos vegetativos e esporos fúngicos.

A publicação do pedido de patente norte-americano US
10 2002/0119136 A1 de Johansen relata uma composição antimicrobiana contendo uma peroxidase *Coprinus*, peróxido de hidrogênio, e um agente melhorador tal como um doador de elétron. A composição é considerada útil para inibir ou matar microorganismos presentes em lavanderia, na pele
15 humana ou de animal, cabelo, membranas de mucosa, cavidades orais, dentes, machucados, contusões, e em superfícies duras. Também a composição pode ser utilizada como um conservante para cosméticos, e para limpeza, desinfetante ou inibidor de crescimento microbiano em
20 equipamentos do processo utilizado para tratamento de água, processamento de alimentos, processos químicos ou farmacêuticos, processamento de polpa de papel e saneamento de água.

As patentes Nos.: US 6,251,386 e US 6,818,212 B2 para
25 Johansen relatam uma composição antimicrobiana contendo uma haloperoxidase, uma fonte de peróxido de hidrogênio, uma fonte de haleto e uma fonte de amônio e um método para utilizar a composição antimicrobiana para matar ou inibir o crescimento de microorganismos. As patentes
30 também descrevem que existe um efeito sinérgico desconhecido entre o haleto e a fonte de amônio.

A patente US 6,149,908 para Claesson et al., relata o uso de lactoperoxidase, um doador de peróxido e tiocianato para a fabricação de um medicamento para tratar a
35 infecção por *Helicobacter pylori*.

A patente US 5,607,681 para Galley et al., descreve composições antimicrobianas contendo ânions de iodeto ou

de tiocianato, glicose oxidase e D-glicose, e lactoperoxidase. A patente declara que as composições podem ser providas em formas não-reagidas concentradas tais como pó seco e soluções não-aquosas. As composições
5 são mencionadas como sendo úteis como conservantes ou como agentes ativos para prover potente atividade antimicrobiana de uso em higiene oral, desodorizante e produtos anti-caspa.

A patente US 5,250,299 para Good et al, relata uma
10 composição antimicrobiana sinérgica composta de um sistema de produção de hipotiocianatos ajustada a um pH entre cerca de 1,5 a cerca de 5 com um ácido di- ou tricarboxílico. O sistema produtor de hipotiocianato é composto de lactoperoxidase, um tiocianato e peróxido de
15 hidrogênio. A patente descreve um método para desinfecção de superfícies associado com preparações de alimentos, e um método para matar *Salmonella* em aves domésticas e outros microorganismos Gram-negativos contaminantes de superfícies de produtos alimentares.

20 A patente US 5,176,899 para Montgomery descreve uma composição dentifrícia antimicrobiana aquosa estabilizada contendo uma enzima oxido-redutase e seus substratos específicos para produzir peróxido de hidrogênio, uma peroxidase agindo no peróxido de hidrogênio para oxidar
25 os íons de tiocianato contidos na saliva para produzir concentrações antimicrobianas de íons de hipotiocianato.

A publicação internacional No. WO 98/49272 para Guthrie et al., ("Knoll Aktiengesellschaft") refere-se a uma composição enzimática antimicrobiana aquosa estabilizada
30 contendo lactoperoxidase, glicose oxidase, sais de haleto de metal alcalino, e um agente de tamponamento quelante resultando em uma composição com um pH especificado. A composição é descrita como sendo útil como um agente antimicrobiano usado em produtos de leite, gênero
35 alimentício e produtos farmacêuticos.

A patente U.S. 5,043,176 para Bycroft et al., refere-se a uma composição antimicrobiana sinérgica compostas de

um polipeptídeo antimicrobiano e um componente hipotiocianato. A atividade sinérgica é mostrada quando a composição é aplicada entre cerca de 30° e 40°C em um pH entre cerca de 3 a cerca de 5. A composição é mencionada como sendo útil contra bactérias Gram-negativas tais como *Salmonella*. Uma composição preferida é nistina, lactoperoxidase, tiocianato e peróxido de hidrogênio. É declarado que a composição é capaz de reduzir o número de células viáveis de *Salmonella* em mais que 6 logs em 10 a 20 minutos.

A patente U.S. No. 4,937,072 para Kessler et al., descreve *in situ* desinfetantes esporicidas compreendendo uma peroxidase, um peróxido ou um material produtor de peróxido, e um sal de iodeto. Os três componentes são armazenados em um estado não-reativo para manter o esporicida em um estado inativo. A mistura dos três componentes em um veículo aquoso causa uma reação catalisada pela peroxidase para produzir radicais antimicrobianos livres e/ou sub-produtos.

Os processos industriais, tais como preparo de papel e processamento de polpa, usam grandes quantidades de água, e é desejável inibir o crescimento de microorganismos durante o referido processamento e na água na entrada e facilitar o armazenamento para os referidos processos.

Conseqüentemente, é desejável ter um método para prevenir, matar e/ou inibir o crescimento de microorganismos que seja acessível/barato e utilize uma composição que seja efetiva em uma concentração baixa e que utilize absolutamente os ingredientes disponíveis.

É também desejável ter um método para prevenir, matar e/ou inibir o crescimento de microorganismos que não utilize clorina ou outro ingrediente ambientalmente indesejável.

Sumário da invenção

Já foi verificado que uma potente solução antimicrobiana para controlar o crescimento de microorganismos em um sistema aquoso e em substratos capazes de suportar o

referido crescimento podem ser obtida pela provisão de lactoperoxidase (relacionado aqui como "LP") peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido tal como percarbonato ou peróxido ou um sistema produtor de peróxido enzimático tal como um sistema glicose oxidase/glicose (GO/glu), um haleto ou um tiocianato e, opcionalmente, uma fonte de amônio, sob condições onde a lactoperoxidase, o peróxido obtido de um peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido, haleto ou tiocianato e amônio obtido de uma fonte de amônio, se presentes, interagem para prover um agente antimicrobiano para o sistema aquoso ou ao substrato. (Um sistema ou solução antimicrobiano contendo lactoperoxidase como descrito aqui pode ser relacionado como um "sistema LP" ou como um "sistema antimicrobiano LP", intercambiáveis). Os componentes individuais podem ser pré-misturados para formar uma solução em água, onde os componentes interagem para formar o agente antimicrobiano, e a solução resultante pode então ser aplicada em uma quantidade efetiva ao sistema aquoso, outros sistemas, ou substratos a serem tratados. Alternativamente, os componentes individuais podem ser adicionados separadamente (ou em qualquer combinação) ao sistema aquoso, outros sistemas, ou substratos a serem tratados, e a concentração de cada um dos componentes pode ser selecionado de modo que uma composição antimicrobiana ativa seja formada *in situ* e mantida por um período desejado de tempo no sistema aquoso, outros sistemas, ou em um substrato a ser tratado.

A presente invenção provê adicionalmente uma composição compreendendo lactoperoxidase (LP), peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido tal como um peróxido de carbamida, perborato ou persulfato ou um sistema produtor de peroxidase enzimática tal como um sistema glicose oxidase/glicose (GO/glu), um haleto ou um tiocianato e, opcionalmente uma fonte de amônio.

A presente invenção provê ainda, uma composição toda sólida que contém pelo menos uma mistura sólida de

lactoperoxidase, brometo de amônio, e um substrato de enzima, tal como glicose, de um sistema produtor de peróxido enzimático em um recipiente solúvel em água, e uma enzima produtora de peróxido, tal como glicose oxidase, em um outro recipiente solúvel em água. Alternativamente, a composição toda sólida no primeiro recipiente solúvel em água acima mencionado, pode ser uma mistura sólida de lactoperoxidase, iodeto de potássio, e o substrato de enzima ou uma mistura sólida de lactoperoxidase, brometo de sódio, sulfato de amônio, e o substrato de enzima. Em um método adicional da presente invenção, uma potente solução antimicrobiana pode ser formada através da dissolução de todos os sólidos nos dois recipientes solúveis em água acima mencionados em uma quantidade desejável de água. A solução resultante pode então ser aplicada em uma quantidade eficaz aos sistemas ou aos substratos a serem tratados. Alternativamente, o conteúdo nos recipientes solúveis em água acima citados pode ser dissolvido separadamente em água para formar duas soluções concentradas separadas, uma solução contendo pelo menos LP, brometo de amônio, e glicose e, a outra solução contendo pelo menos glicose oxidase. As soluções resultantes podem então ser adicionadas, separadamente, em uma quantidade eficaz aos sistemas ou aos substratos a serem tratados, onde as soluções interagem no sistema aquoso para formar a composição antimicrobiana.

O sistema LP descrito aqui produz uma potente composição antimicrobiana que é preferivelmente, muito mais forte do que a ação do peróxido de hidrogênio sozinho. A presente solução pode ser aplicada em uma variedade de sistemas fluidos industriais (por exemplo, sistemas aquosos) e processos, incluindo, mas não se limitando a, sistemas de água para preparo de papel, mistura fraca de polpa, processo de fazer papel em água pura/potável, sistema de resfriamento de água (Torres de arrefecimento, tomada de água de resfriamento e efluentes de águas de

resfriamento), sistemas de águas residuais, sistema de recirculação de água, tubos de aquecimento, águas de piscinas, sistemas de água recreacional, um sistema de processamento de alimento, um sistema de água potável, um sistema de água para processamento de couro, um sistema de trabalho em metal, e outros sistemas de água industriais. O método da presente invenção pode também ser aplicado ao controle do crescimento de microorganismos em vários substratos, incluindo, mas não limitado a, revestimento de superfícies, metais, materiais poliméricos, substratos naturais (por exemplo, pedra), construção, concreto, madeira, pintura, sementes, plantas, peles de animais, plásticos, cosméticos, produtos de cuidados pessoais, preparações farmacêuticas, e outros materiais industriais.

Características adicionais e vantagens da presente invenção serão representadas em parte na descrição a seguir, e em parte serão aparentes a partir da descrição ou podem ser apreendidas através da prática da presente invenção. Os objetivos e outras vantagens da presente invenção serão realizados e estão ligados aos meios dos elementos e combinações particularmente apontadas na descrição e nas reivindicações anexas.

Deve ser entendido que ambas as descrições geral anterior e a descrição detalhada a seguir são exemplificativas apenas e não são restritivas à presente invenção, como reivindicada. Todas as patentes, os pedidos de patente, e as publicações mencionadas acima e durante a descrição do pedido de patente são incorporadas aqui na íntegra por referência.

Os desenhos que acompanham o pedido, são incorporados em e constituem uma parte deste pedido, ilustram algumas das configurações da presente invenção e juntos com o relatório, servem para explicar os princípios da presente invenção.

Breve descrição dos desenhos

A figura 1 é um gráfico comparativo da eficácia

antibacteriana de vários sistemas lactoperoxidasas contra *P. aeruginosa* em tampão fosfato (pH 6.0), em várias concentrações de H_2O_2 ;

5 A figura 2 é um gráfico comparativo da eficácia antibacteriana de H_2O_2 por si só, $H_2O_2-NH_4Br$ e $LP-H_2O_2-NH_4Br$ contra *P. aeruginosa* em tampão fosfato (pH 6.0), em várias concentrações de H_2O_2 ;

10 A figura 3 é um gráfico comparativo da eficácia antibacteriana de H_2O_2 por si só, $H_2O_2-NH_4Br$ e $LP-H_2O_2-NH_4Br$ contra *P. aeruginosa* em polpa semilíquida, com um tempo de tratamento de 18 horas e em várias concentrações de H_2O_2 ;

15 A figura 4 é um gráfico comparativo da eficácia antibacteriana de H_2O_2 por si só, H_2O_2-KI e $LP-H_2O_2-KI$ contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com um tempo de tratamento de 30 minutos e, em várias concentrações de H_2O_2 ;

20 A figura 5 é um gráfico comparativo da eficácia antibacteriana de $LP-NaBO_3-NH_4Br$ e $NaBO_3-NH_4Br$ contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com um tempo de tratamento de 18 horas e em várias concentrações de $NaBO_3$;

25 A figura 6 é um gráfico comparativo da eficácia antibacteriana de $LP-NaPerC-NH_4Br$ e $NaPerC-NH_4Br$ contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com um tempo de tratamento de 18 horas e em várias concentrações de $LP-NaPerC$;

30 A figura 7 é um gráfico comparativo da eficácia antibacteriana de $LP-CP-NH_4Br$ e CP (peróxido de carbamida) apenas, contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com um tempo de tratamento de 24 horas e em várias concentrações de CP ;

35 A figura 8 é um gráfico mostrando a eficácia antibacteriana de $LP-H_2O_2-NH_4Br$ contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com uma concentração constante de H_2O_2 e NH_4Br e como uma função da concentração de LP ;

A figura 9 é um gráfico mostrando a eficácia

antibacteriana de LP-H₂O₂-NH₄Br contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com uma concentração constante de H₂O₂ e LP e como uma função da concentração de NH₄Br;

5 A figura 10 é um gráfico mostrando a eficácia antibacteriana de LP-H₂O₂-NH₄Br contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com uma concentração constante de NH₄Br e LP e como uma função da concentração de H₂O₂;

A figura 11 é um gráfico comparativo da eficácia antibacteriana de LP-NH₄Br-GO/Gli e GO/Gli sozinho contra
10 *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida, com um tempo de tratamento de 24 horas e em várias concentração de GO; e
A figura 12 é um gráfico do tempo de morte comparando os efeitos antibacterianos de LP-NH₄Br-GO/Gli e GO/Gli sozinho contra *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida.

15 Descrição detalhada da presente invenção

A presente invenção provê métodos e composições para controlar o crescimento de microorganismos em sistemas aquosos ou em substratos usando (a) lactoperoxidase (LP), (b) peróxido de hidrogênio ou uma Fonte de peróxido de
20 hidrogênio, e (c) um haleto, mais, opcionalmente, uma fonte de amônio, tal como um sal. O haleto e a fonte de amônio podem ambos serem providos na forma de brometo de amônio. Por exemplo, a combinação de LP, peróxido de hidrogênio, e um haleto, ou a combinação de LP, um
25 peróxido de hidrogênio, um haleto e um sal de amônio, foram uma composição antimicrobiana forte que é preferivelmente muito mais ativa do que o trabalho de o peróxido de hidrogênio sozinho. A presente invenção provê um método para controlar o crescimento de pelo
30 menos um microorganismo em ou em um produto, material, ou em um meio suscetível ao ataque por microorganismos. Este método inclui a etapa de adicionar ao produto, material, ou meio uma composição da presente invenção em uma quantidade efetiva para controlar o crescimento do
35 microorganismo. A quantidade eficaz varia de acordo com o produto, material, ou meio a ser tratado e pode, para uma aplicação particular, ser determinada rotineiramente por

um técnico no assunto em vista da descrição aqui provida. As composições da presente invenção são úteis na conservação ou no controle do crescimento de pelo menos um microorganismo em vários tipos de produtos industriais, meios, ou materiais suscetíveis ao ataque por microorganismos. Os referidos meios ou materiais incluem, mas não se limitam a, por exemplo, corantes, pastas, tábuas, couros, têxteis, polpas, lascas de madeira, licor de bronzeamento de couro, licor de moagem de papel, emulsões poliméricas, pinturas, papel e outros revestimentos e agentes de ajuste, fluidos de trabalho em metal, lubrificantes de perfuração geológica, petroquímicos, sistemas de refrigeração de água, águas de recreação, águas para regar plantas, águas residuais, pasteurizações, fogão de destilação, formulações farmacêuticas, formulações cosméticas, e formulações de produtos cosméticos. A composição também pode ser útil em formulações agro-químicas para o propósito de proteção de sementes ou safra contra destruição microbiana.

A composição provê preferivelmente atividade microbicida superior em baixas concentrações contra uma ampla faixa de microorganismos.

As composições da presente invenção podem ser úteis em um método para controle do crescimento de pelo menos um microorganismo em ou no produto, material, ou a um meio suscetível ao ataque por microorganismos. Este método inclui a etapa de adicionar ao produto, material ou ao meio, uma composição da presente invenção, onde os componentes da composição estão presentes em uma quantidade efetiva para controlar o crescimento do microorganismo.

Como declarado anteriormente, as composições da presente invenção são úteis na conservação de vários tipos de produtos industriais, meios, ou materiais suscetíveis ao ataque por, pelo menos um microorganismo. As composições da presente invenção também são úteis em formulações agroindustriais para o propósito de proteção de sementes

ou da safra contra destruição microbiana.

De acordo com os métodos da presente invenção, controlar ou inibir o crescimento de pelo menos um microorganismo incluem a redução e/ou a conservação dos referidos crescimentos.

Deve ser ainda entendido que por "controlar" (por exemplo, prevenção) o crescimento de pelo menos um microorganismo, o crescimento do microorganismo é inibido. Em outras palavras, não existe crescimento ou essencialmente nenhum crescimento do microorganismo. "Controlar" o crescimento de pelo menos um microorganismo mantém a população do microorganismo em um nível desejado, reduz a população a um nível desejado (mesmo em limites indetectáveis, por exemplo, população zero), e/ou inibe o crescimento de microorganismos. Assim, em uma configuração da presente invenção, os produtos, os materiais, ou os meios suscetíveis ao ataque por pelo menos um microorganismo são preservados deste ataque e a destruição resultante e outros efeitos danosos causados pelos microorganismos. Adicionalmente, deve ser também entendido que "controlar" o crescimento de pelo menos um microorganismo também inclui reduzir, bioestatisticamente e/ou manter um nível baixo de pelo menos um microorganismo de modo que o ataque por microorganismo e qualquer destruição resultante ou outro efeito danoso seja suavizado, ou seja, a taxa de crescimento do microorganismo ou a proporção do ataque do microorganismo é reduzida e/ou eliminada.

Exemplos destes microorganismos incluem fungos, bactérias, algas e misturas destes, tais como, mas não limitado a, por exemplo, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Chlorella* sp. As composições da presente invenção têm uma baixa toxicidade.

As lactoperoxidase é uma glicoproteína com um grupo heme de ligação não-covalente. É parte do sistema de defesa não-imune em leite e está presente em leite nas

concentrações de cerca de 30 mg/L. É também presente em vários fluidos do corpo, tal como saliva, lágrimas, e secreções nasais e intestinais.

O LP difere da haloperoxidase na medida em que é uma
5 enzima que pode ser derivada de leite bovino como um produto natural da indústria de laticínios, enquanto que haloperoxidase é uma enzima que é obtida de fungo ou bactéria por fermentação ou por tecnologia de DNA recombinante. Uma outra diferença entre a LP e as
10 haloperoxidasas é que a haloperoxidase pode catalizar a oxidação de Cl^- ; enquanto LP não pode. LP está atualmente disponível em uma escala industrial e em uma forma muito purificada, enquanto a haloperoxidase está disponível apenas em quantidades em uma escala experimental.
15 Portanto, LP é menos oneroso do que a haloperoxidase. Assim, as maiores vantagens de LP sobre haloperoxidase são sua disponibilidade em larga escala e seu custo relativamente baixo quando comparado com a haloperoxidase.
20 Apesar de as haloperoxidasas não terem atividade antimicrobiana por si mesmas, em presença de H_2O_2 , ela cataliza a oxidação de Br^- , I^- , ou SCN^- , mas não Cl^- , para produzir produtos antimicrobianos. LP, H_2O_2 e substratos oxidáveis tais como Br^- , I^- ou SCN^- juntos forma um
25 potente sistema antimicrobiano. A eficácia antimicrobiana dos sistemas antimicrobianos de lactoperoxidase ("sistemas antimicrobiano LP") é mediada pela produção dos produtos de oxidação de Br^- , I^- ou SCN^- , principalmente os hipohaleto e hipotiocianatos. Os
30 sistemas antimicrobianos LP requerem níveis muito baixos de H_2O_2 e doadores de elétrons para produção de produtos antimicrobianos. Como descrito aqui, a adição de um íon de amônio melhora ainda a atividade antimicrobiana quando incluída em um sistema antimicrobiano LP. Em particular,
35 a combinação de lactoperoxidase, peróxido ou uma fonte de peróxido, e brometo de amônio provê uma utilização particularmente e um sistema antimicrobiano econômico.

As lactoperoxidase da presente invenção podem ser obtidas a partir de qualquer fonte de mamífero tal como leite de mamífero, particularmente leite bovino. Adicionalmente, a lactoperoxidase é facilmente disponível a partir de fontes comerciais. A lactoperoxidase pode estar na forma de um pó seco ou pode ser uma solução aquosa. Em uma forma comercial típica, LP é um pó castanho-esverdeado, contendo mais que 90% de proteína. A enzima demonstra um amplo perfil de estabilidade (pH 3 - 10) com um pH ótimo de 5,0 - 6,5. A enzima pode ser armazenada em temperatura ambiente. Em um pacote selado original, tal como aqueles obtidos a partir de uma fonte comercial, o LP tem uma vida de prateleira de pelo menos 1 ano a 20°C e 2 anos a 8°C. A exposição da enzima a temperatura elevada (> 65°C) por um curto período (10 minutos) resulta na desnaturação da proteína e perda da atividade.

O peróxido de hidrogênio (que pode ser considerado como fonte de peróxido) usado no sistema antimicrobiano LP da presente invenção pode ser derivado de muitas vias diferentes: ele pode ser uma solução concentrada ou uma solução de peróxido de hidrogênio diluída, ou pode ser obtido de um precursor de peróxido de hidrogênio, tal como percarbonato, perborato, peróxido de carbamida (também chamado de peróxido de hidrogênio de uréia), ou persulfato. Ele pode ser obtido a partir de um sistema produtor de peróxido de hidrogênio enzimático, tal como glicose oxidase acoplada com glicose ou amilase/amido (que gera glicose) mais glicose oxidase. Outras combinações de enzima/substrato que geram peróxido de hidrogênio podem ser utilizadas. É vantajoso para uso o peróxido de hidrogênio gerado enzimaticamente, uma vez que todos os materiais envolvidos são ambientalmente corretos. É muito fácil para transportar e para manusear estes materiais do que o peróxido de hidrogênio por si mesmo.

O haleto utilizado no sistema antimicrobiano LP da presente invenção pode ser obtido de qualquer fonte de

haleta ou fonte produtora e pode ser de muitas fontes diferentes. Ele pode ser brometo de amônio, brometo de sódio, brometo de potássio, brometo de cálcio, brometo de magnésio, iodeto de sódio, iodeto de potássio, iodeto de amônio, iodeto de cálcio, e/ou iodeto de magnésio. Pode ser qualquer um dos sais de haleta de metais alcalinos ou metais alcalinos terrosos. No sistema antimicrobiano LP da presente invenção, os completos de cloreto são, preferivelmente, excluídos como uma fonte de haleta, uma vez que a lactoperoxidase não cataliza a oxidação de Cl^- . Os tiocianatos, tais como tiocianato de sódio, tiocianato de amônio, tiocianato de potássio pode também ser utilizado como o doador de elétron ao invés de um haleta no sistema antimicrobiano LP.

O amônio que pode ser utilizado no sistema antimicrobiano LP para prover efeitos antimicrobianos sinérgicos adicionais de acordo com a presente invenção podem ser obtidos a partir de qualquer fonte de amônio. A fonte de amônio pode ser um sal de amônio. Como um exemplo não-limitativo, ambos o haleta e o amônio podem ser providos por um haleta de amônio, tal como brometo de amônio (NH_4Br). Como um exemplo não-limitativo adicional, o haleta e o amônio podem ser providos por brometo de sódio e sulfato de amônio, respectivamente. Como um exemplo não-limitativo adicional, o haleta pode ser iodeto de potássio e a fonte de amônio pode ser omitida.

Como um método para matar, ou prevenir, ou inibir o crescimento de microorganismos em um sistema aquoso ou em um substrato que é capaz de suportar o crescimento de microorganismo, a lactoperoxidase, peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido, haleta ou tiocianato e, opcionalmente, uma fonte de amônio, pode ser provida ao sistema aquoso ou um substrato que é capaz de suportar um crescimento de microorganismos sob condições onde a lactoperoxidase, peróxido de peróxido de hidrogênio ou fonte de peróxido, haleta ou tiocianato e amônio a partir da fonte de amônio (se presente) interagem para prover um

agente antimicrobiano que mata, previne, ou inibe o crescimento de microorganismos no sistema aquoso ou no substrato.

Um técnico no assunto pode determinar rapidamente a
5 quantidade efetiva de várias composições da presente invenção úteis para uma aplicação particular por simples teste de várias concentrações antes do tratamento de um substrato ou sistema afetado completamente. Por exemplo, em um sistema aquoso a ser tratado, a concentração da
10 lactoperoxidase pode estar qualquer em quantidade efetiva, tal como em uma faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, e é preferivelmente em uma faixa de cerca de 0,1 a cerca de 50 ppm.

A fonte de peróxido pode ser presente no sistema aquoso
15 em qualquer quantidade efetiva, tal como em uma quantidade suficiente para prover uma concentração de peróxido de hidrogênio no sistema aquoso em uma faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm e, preferivelmente, na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 200 ppm.

20 O haleto ou tiocianato pode estar presente no sistema aquoso em qualquer quantidade efetiva, tal como em uma concentração no sistema aquoso em uma faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10000 ppm, e preferivelmente na faixa de cerca de 1 a cerca de 500 ppm.

25 A fonte de amônio pode estar presente no sistema aquoso em qualquer quantidade efetiva, tal como em uma concentração suficiente para prover uma concentração de íon de amônio no sistema aquoso em uma faixa de cerca de 0,0 a cerca de 10000 ppm ou em uma faixa de cerca de 0,1
30 a cerca de 10000 ppm, e preferivelmente na faixa de cerca de 0 a cerca de 500 ppm ou em uma faixa de cerca de 1 a cerca de 500 ppm.

As concentrações dos componentes de um sistema LP antimicrobiano, tais como lactoperoxidase, peróxido de
35 hidrogênio, haleto ou tiocianato e amônio como descrito acima ou como descrito de outro modo neste pedido, pode ser as concentrações iniciais dos componentes em um tempo

em que componentes são combinados ou adicionado em um sistema aquoso e/ou pode ter concentrações de componentes em qualquer tempo após os componentes terem interagido um com o outro.

- 5 A presente invenção também incorpora a adição separada dos componentes da composição aos produtos, materiais, ou meio. De acordo com esta configuração, os componentes são individualmente adicionados aos produtos, materiais, ou meios de modo que a quantidade final de cada um dos
- 10 componentes presentes no tempo de uso é que a quantidade efetiva para controlar o crescimento de pelo menos um microorganismo. De acordo com um aspecto da presente invenção, a lactoperoxidase, o peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido, haleto ou tiocianato, e a fonte de
- 15 amônio opcional pode ser adicionada separadamente em um sistema aquoso a ser tratado. Por exemplo, um haleto e, opcionalmente, uma fonte de amônio pode ser adicionado primeiro ao sistema de aquoso a ser tratado, e então a lactoperoxidase pode ser adicionada, e o peróxido de
- 20 hidrogênio pode ser adicionado ao final. A ordem de adição do componente não é crítica e qualquer ordem pode ser utilizada. Preferivelmente, a ordem de adição é (1) haleto/amônio, (2) LP, e (3) peróxido de hidrogênio ou outra fonte de peróxido.
- 25 De acordo com um outro aspecto da presente invenção, os componentes de um sistema antimicrobiano LP como descrito aqui pode ser pré-misturado em água para formar uma solução aquosa concentrada. A solução aquosa concentrada pode então ser aplicada em um sistema aquoso ou em um
- 30 substrato a ser tratado. A concentração da lactoperoxidase, peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido, haleto ou tiocianato, e uma fonte de amônio opcional pode ser selecionado para otimizar a atividade antimicrobiana do sistema antimicrobiano LP.
- 35 A concentração de LP na solução pré-misturada pode estar na faixa de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, com uma faixa preferida de cerca de 0,05% em peso a cerca

de 0,5% em peso. Toda porcentagem em peso aqui descrita é em relação ao peso da solução pré-misturada. A fonte de peróxido pode estar presente na solução pré-misturada em uma quantidade suficiente para prover uma concentração de peróxido de hidrogênio na solução pré-misturada em uma faixa de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em peso, com uma faixa preferida de cerca de 0,15% em peso a cerca de 1,5% em peso. O haleto ou a fonte de tiocianato pode estar presente na solução pré-misturada em uma concentração suficiente para prover um haleto ou uma concentração de tiocianato na solução pré-misturada na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, com uma faixa preferida de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso. A fonte de amônio pode estar presente na solução pré-misturada em uma concentração suficiente para prover uma concentração de amônio na solução pré-misturada em uma faixa de 0,0% em peso a cerca de 50% em peso ou de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, com uma faixa preferida de cerca de 0,0% em peso a cerca de 5% em peso ou de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso.

Como um exemplo, a lactoperoxidase, o brometo de amônio, peróxido de hidrogênio, e água pode ser combinada (por exemplo, misturado) para formar uma solução antimicrobiana concentrada ativa. Toda a porcentagem em peso aqui foi em peso da solução antimicrobiana. Na solução antimicrobiana concentrada, a lactoperoxidase pode estar na faixa de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, com uma faixa preferida de cerca de 0,05% em peso a cerca de 0,5% em peso, o peróxido de hidrogênio pode estar na faixa de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em peso, com uma faixa preferida de cerca de 0,15% em peso a cerca de 1,5% em peso e o brometo de amônio em uma faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, com uma faixa preferida de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso. A proporção em peso de $LP:H_2O_2:NH_4Br$ pode variar de cerca de 1:1:5 a cerca de 1:10:100, com uma

proporção de peso preferível em cerca de 1:3:1. A solução concentrada pode ser aplicada em um sistema aquoso ou em um substrato a ser tratado.

A mistura de componentes de um sistema antibacteriano LP
5 como uma solução pré-misturada concentrada pode ser conseguida por qualquer método que é conhecido na técnica. Por exemplo, o sal de brometo e a lactoperoxidase podem ser adicionados como sólidos à água para formar uma solução, então uma solução de peróxido de
10 hidrogênio pode ser adicionada para formar a composição final. Alternativamente, uma solução aquosa de sal de brometo pode ser preparada primeiramente e um LP sólido pode ser adicionado depois, e então uma solução de peróxido de hidrogênio. Alternativamente, se a fonte de
15 peróxido de hidrogênio é um precursor sólido tal como um percarbonato ou perborato ou um sistema produtor de H_2O_2 enzimático, os componentes do sistema antimicrobiano LP podem ser adicionados à água na forma sólida.

Ainda, como uma outra alternativa, os componentes de um
20 sistema antimicrobiano LP pode ser combinado como soluções. Por exemplo, uma solução de brometo de amônio aquoso e uma solução LP aquosa pode ser combinada para formar uma solução misturada de LP/NH_4Br , e então uma solução H_2O_2 aquosa pode ser adicionada. A solução H_2O_2
25 aquosa pode ser derivada tanto a partir de uma diluição da solução H_2O_2 concentrada quanto da dissolução de um precursor sólido H_2O_2 tal como um percarbonato ou um perborato ou um sistema gerador de H_2O_2 enzimático em água. Esta alternativa provê um caminho fácil de
30 tratamento em um sistema aquoso ou em um substrato. Uma solução de brometo de amônio aquosa e uma solução LP aquosa pode ser preparada em tanques separados e então combinados em quantidades desejadas em um tanque de mistura para formar uma solução inativa de LP/NH_4Br , a
35 qual pode ser armazenada. Quando o agente antimicrobiano é necessário, a solução de LP/NH_4Br pode ser combinada com uma solução aquosa de H_2O_2 para formar uma solução

aquosa antimicrobiana a ser utilizada. É preferido preparar uma solução misturada de LP/ NH_4Br em um tanque simples, e então adicionar a solução H_2O_2 para ativar o sistema LP antimicrobiano.

- 5 A presente invenção provê ainda para uma composição toda sólida na qual os componentes de um sistema antimicrobiano LP que pode ser armazenada e mantida em um estado não-reativo e então combinada com água quando necessário para formar um agente antimicrobiano. Por
- 10 exemplo, para um sistema antimicrobiano compreendendo lactoperoxidase, uma fonte de haleto, uma fonte de amônio ótima e um sistema gerador de peróxido de hidrogênio enzimático, tal como glicose oxidase acoplada com a glicose ou amilase/amido mais glicose oxidase, uma
- 15 mistura sólida de lactoperoxidase, a fonte de haleto, a fonte de amônio ótima e o substrato para o sistema gerador de peróxido de hidrogênio enzimático pode ser armazenado em um recipiente e a enzima para o sistema gerador de peróxido de hidrogênio enzimático pode ser
- 20 armazenada separadamente em um outro recipiente. Se os recipientes solúveis em água são utilizados, um agente antimicrobiano pode ser produzido por combinação dos recipientes com água para dissolver os componentes neste para formar uma solução concentrada, ou por adição dos
- 25 recipientes diretamente em um sistema aquoso. Alternativamente, os recipientes pode ser separadamente adicionados ao sistema aquoso a ser tratado.
- Como um exemplo específico, uma mistura sólida de lactoperoxidase, brometo de amônio e glicose pode ser
- 30 provida em um saco ou em um recipiente solúvel em água e, uma glicose oxidase pode ser provida em um outro saco ou recipiente solúvel em água. Dissolver todos os sólidos nos dois sacos solúveis em água acima descritos em uma quantidade desejada de água forma uma solução
- 35 antimicrobiana potente. A solução resultante pode então ser aplicada em uma quantidade efetiva para um sistema aquoso ou substrato a ser tratado. Alternativamente,

ambos os sacos podem ser diretamente adicionados em um sistema aquoso a ser tratado, ou os dois sacos podem ser adicionados separadamente ao sistema aquoso. Um outro exemplo específico, ao invés de dois recipientes separados, para armazenamento de componentes sólidos, um recipiente simples tendo câmaras separadas poderia ser utilizado, enquanto existir separação suficiente de modo que os componentes do sistema antimicrobiano LP se mantenham em uma forma sólida e inativa antes deles serem expostos à água. Por exemplo, uma câmara poderia conter uma mistura sólida de lactoperoxidase, brometo de amônio, e glicose e a outra câmara poderia conter uma glicose oxidase sólida. É preferido manter todos os ingredientes do sistema antimicrobiano LP em uma forma não-reativa antes da mistura com água. Preferivelmente, em um sistema de armazenamento onde a glicose oxidase é mantida separadamente na forma sólida, a glicose oxidase pode ser mantida em uma condição anaeróbica de modo que o oxigênio seja separado fisicamente da glicose oxidase, mantendo, desse modo, a glicose oxidase em uma forma substancialmente não reativa.

Em uma composição toda sólida, o sistema antimicrobiano LP compreende glicose oxidase, lactoperoxidase, brometo de amônio e glicose (com glicose oxidase armazenada separadamente a partir de outros componentes), a proporção em peso para os quatro componentes, glicose oxidase: LP:NH₄Br:glicose, pode estar na faixa de cerca de 1:1:10:100 a cerca de 1:5:100:5000, com uma proporção em peso preferivelmente de cerca de 1:4:100:2000.

Dependendo da aplicação específica, a composição pode ser preparada na forma líquida por dissolução da composição em água ou em um solvente orgânico, ou na forma seca por adsorção em um veículo adequado, ou composição na forma de tablete. O conservante contendo a composição da presente invenção pode ser preparado em uma forma de emulsão por emulsificação deste em água, ou se necessário, por adição de um surfactante. Químicos

adicionais, tais como inseticidas, podem ser adicionados às preparações antecedentes dependendo do uso pretendido da preparação.

A forma, bem como as proporções de aplicação da
5 composição da presente invenção podem variar dependendo do uso pretendido. A composição poderia ser aplicada por aspersão ou escovação no material ou produto. O material ou produto em questão poderia também ser tratado por
imersão em uma formulação adequada da composição. Em um
10 meio líquido ou do tipo líquido, a composição poderia ser adicionada ao meio por vertente, ou por medição com um dispositivo adequado de modo que a solução ou uma dispersão da composição possa ser produzida.

Por exemplo, uma solução antimicrobiana concentrada pode
15 ser derivada da solução completamente sólida descrita acima por dissolução de glicose oxidase, lactoperoxidase, brometo de amônio e glicose em água. A solução resultante pode ser então aplicada em um sistema aquoso ou um substrato a ser tratado. Em um sistema aquoso, os
20 componentes do sistema antimicrobiano LP pode ser adicionado separadamente ou em uma solução pré-misturada para prover o sistema com as quantidades efetivas a seguir:

(a) LP: de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm,
25 preferivelmente na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 50 ppm.

(b) NH_4Br : de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, preferivelmente na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 500 ppm.

30 (c) Glicose oxidase: de cerca de 0,01 a cerca de 500 ppm, preferivelmente na faixa de cerca de 0,05 a cerca de 50 ppm.

(d) Glicose: de cerca de 1 a cerca de 1000 ppm, preferivelmente na faixa de cerca de 10 a cerca de 5000
35 ppm.

Como um exemplo adicional não limitante, específico, o sistema antimicrobiano LP pode compreender LP, uma fonte

de peróxido, iodeto de potássio, e uma fonte de amônio adicional. Como um exemplo não-limitativo, ainda mais específico, o sistema antimicrobiano LP pode compreender LP, H_2O_2 e KI. As quantidades e cada componente podem ser

5 como descrito genericamente acima para as quantidades de LP, fonte de peróxido, fonte de haleto e a fonte de amônio opcional para um sistema antimicrobiano LP. Em particular, a quantidade de KI utilizada em um sistema antimicrobiano LP contendo KI pode ser a mesma como a

10 quantidade de NH_4Br em um sistema antimicrobiano LP contendo NH_4Br como descrito acima. Tal como sistema antimicrobiano LP contendo KI pode estar em qualquer forma física descrita acima para um sistema antimicrobiano LP.

15 Como um exemplo adicional específico, não-limitante, o sistema antimicrobiano LP pode compreender LP, uma fonte de peróxido, brometo de sódio, e sulfato de amônio. As quantidades de cada um dos componentes podem ser como descrito genericamente acima para as quantidades de LP,

20 fonte de peróxido, fonte de haleto e a fonte de amônio opcional para um sistema antimicrobiano LP. Em particular, a quantidade de NaBr e $(NH_4)_2SO_4$ utilizada em um sistema antimicrobiano LP contendo NaBr e $(NH_4)_2SO_4$ pode ser selecionada para prover a mesma quantidade de

25 NH_4 e Br como é provido em um sistema antimicrobiano LP contendo NH_4Br como descrito acima. Como um sistema antimicrobiano LP contendo NaBr e $(NH_4)_2SO_4$ pode ser em qualquer uma das formas físicas descritas acima para um sistema antimicrobiano LP.

30 O método da presente invenção pode ser praticado em qualquer pH, tal como uma faixa de pH de cerca de 2 a cerca de 11, com uma faixa de pH preferível de cerca de 5 a cerca de 9. O pH da solução pré-misturada do sistema antimicrobiano LP pode ser ajustado por adição de um

35 ácido(s) ou uma base(s) como é conhecido da técnica. O ácido ou a base adicionado pode ser selecionado para não reagir com qualquer componente no sistema. Entretanto, é

preferível para misturar aos componentes do sistema LP em água sem o ajuste do pH. O pH de uma solução pré-misturada de LP-H₂O₂-NH₄Br sem o ajuste de pH é em torno de 6,9. em um pH em torno de neutro (7,0), o sistema antimicrobiano LP produz a atividade máxima.

O método da presente invenção pode ser utilizado em qualquer sistema aquoso industrial ou recreacional requerendo o controle de microorganismos. Os tais sistemas aquosos incluem, mas não estão limitados a, fluidos de trabalho em metal, sistema de resfriamento de água (torres de arrefecimento, tomada de água de resfriamento e efluentes de águas de resfriamento), sistemas de águas residuais incluindo águas residuais ou tratamento de águas de saneamento dos resíduos em água, por exemplo, tratamento de esgoto, sistemas de água de recirculação, águas de recreação (piscina), tubos de aquecimento, um sistema de processamento de alimento, um sistema de água potável, um sistema de água para processamento de couro, um sistema de água pura, sistemas de água de processamento polpa semi líquida ou outros sistemas de água para processamento de papel ou para preparo de papel. Em geral, qualquer sistema de água industrial ou recreacional pode se beneficiar a partir da presente invenção. O método da presente invenção também pode ser utilizado no tratamento de tomada de água para vários processos industriais ou facilitar a recreação. A tomada de água pode ser tratada, primeiramente, pelo método da presente invenção de modo que o crescimento microbiano é inibido antes da tomada de água entrar nos processos industriais ou instalação recreacional.

O método da presente invenção também pode ser aplicado para prevenir ou inibir o crescimento dos microorganismos em qualquer substrato que é de outro modo capaz de suportar tal crescimento. Exemplos de substratos incluem, mas não estão limitados a, revestimentos de superfícies, madeiras, metais, polímeros, substratos naturais (por exemplo, pedra), construção, concreto, tábuas, sementes,

plantas, couros, plásticos, cosméticos, produtos de cuidados pessoais, preparações farmacêuticas, e outros materiais industriais. Adicionalmente, os substratos incluem superfícies duras em sistemas aquosos, plantas para processamento de alimentos e hospitais e em equipamentos para preparo de papel e equipamentos de agricultura.

A presente invenção será descrita, adicionalmente, através dos exemplos a seguir, os quais pretendem ser uma forma exemplificativa da presente invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Eficácia antibacteriana de vários sistemas de lactoperoxidase contra *P aeruginosa* em tampão fosfato (pH 6,0).

LP, H₂O₂, e também KI, NH₄Br, NaSCN ou NaBr como doadores de elétrons foram adicionados separadamente ao tampão fosfato, em tubos de teste, nas concentrações desejadas, para formar os vários sistemas antimicrobianos LP. O tampão foi então inoculados com 3×10^6 células/ml de *P. aeruginosa*. Em um tempo de contato (tratamento) de 4 horas após a inoculação, 1,0 ml de líquido foi retirado a partir do tubo de teste e plaqueado em agar nutriente em 10^{-2} , 10^{-3} , e 10^{-4} diluições usando solução de desativação biocida como a diluição sem interesse. As placas de agar foram incubadas a 37°C durante 2-3 dias, e as colônias foram contadas. A porcentagem de morte e a redução do log foram calculadas com base em cfu/ml da cultura controle. A cultura controle contém, apenas, células bacterianas em 5 ml de tampão fosfato.

A figura 1 resume a atividade bactericida dos sistemas LP com diferentes doadores de elétrons contra *P. aeruginosa* em tampão fosfato (pH 6) com um tempo de tratamento de 4 horas como descrito acima. A concentração de LP foi de 200 ppm para todos os sistemas e a concentração de cada um dos doadores de elétron individual foi de 0,02 M. A concentração de H₂O₂ foi variada, como mostrado na figura 1. Como pode ser visto a partir dos resultados, LP

combinado com H_2O_2 e um doador de elétron tal como KI, NH_4Br , ou NaSCN formando potentes sistemas antimicrobianos LP. A atividade antimicrobiana variando como diferentes doadores de elétrons foram utilizadas no sistema. Os resultados mostraram que o sistema de LP- H_2O_2 -KI foi mais forte em termos de atividade dentre os sistemas LP testados. O próximo sistema antimicrobiano forte foi LP- H_2O_2 - NH_4Br , o qual provê uma redução de log maior que 4,5

10 Quando a concentração de H_2O_2 foi de 5 ppm e acima. Mostrando que o sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br teve resultados comparáveis ao do LP- H_2O_2 -KI em uma concentração H_2O_2 acima de 5 ppm foi significante uma vez que NH_4Br é muito menos oneroso que KI e é um material amplamente

15 disponível. Conseqüentemente, o sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br teve um potencial maior para desenvolvimento de uma enzima com base no sistema antimicrobiano para várias indústrias. Os outros dois sistemas, denominados LP- H_2O_2 - NH_4Br e LP- H_2O_2 -NaSCN, não resulta geralmente como um bom sistema LP-

20 H_2O_2 - NH_4Br com relação à eficácia. Suas atividades foram cerca de a mesma ou pior do que a atividade de H_2O_2 sozinho (ver a figura 2). Em particular, em comparação com os resultados do sistema de LP- H_2O_2 - NH_4Br com os resultados do sistema LP- H_2O_2 -NaBr, os dados mostraram

25 uma melhora dramática quando NH_4Br é utilizado ao invés de NaBr.

Como uma comparação, um teste usando H_2O_2 sozinho em um tampão sem a adição de um doador de elétron e uma enzima e um teste usando H_2O_2 e NH_4Br sem a enzima foram

30 realizadas contra *P. aeruginosa* em tampão fosfato (pH 6) com um tempo de tratamento de 4 horas. Como descrito acima, a concentração LP para o sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br foi de 200 ppm. A concentração de NH_4Br foi de 0,02 M, para ambos os sistemas LP- H_2O_2 - NH_4Br e H_2O_2 - NH_4Br . A

35 concentração de H_2O_2 foi variada como mostrado na figura 2. A figura 2 mostra uma vantagem clara do sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br sobre o H_2O_2 - NH_4Br e o H_2O_2 sozinho. Em

particular, a adição de LP para os resultados H_2O_2 - NH_4Br um aumento na atividade de mais do que 2 logs como comparado com a atividade de H_2O_2 - NH_4Br sem a enzima. É presumível que a enzima auxilia a impulsionar a reação
 5 de $H_2O_2 + NH_4Br \rightarrow Br_2 + (HOBr) + NH_2Br + H_2O$ em direção a ao lado direito da mão, produzindo assim, mais e mais fortes produtos antimicrobianos.

Exemplo 2: Eficácia antibacteriana de vários sistemas de lactoperoxidase contra *P. aeruginosa* em polpa semi-
 10 líquida.

Os componentes dos sistemas LP foram adicionados separadamente à polpa semi-líquida para formar vários sistemas antimicrobianos LP. Um procedimento teste similar àquele descrito no Exemplo 1 foi utilizado para a
 15 avaliação atual. A modificação apenas foi utilizado na polpa semi-líquida para substituir o tampão fosfato. A polpa semi-líquida contida em uma polpa seca branca em 5g/L; amido catiônico em 0,025 g/L; $CaCO_3$ a 0,75 g/L; tamanho ASA em 0,01 g/L; auxiliar de retenção em 0,0025
 20 g/L; desespumante em 0,0012 g/L. A polpa semi-líquida teve uma consistência de cerca de 0,5 a 0,7% de sólidos. O pH final da polpa semi-líquida após o autoclave foi de cerca de 7,5 - 8,0.

A atividade antibacteriana do sistema $LP-H_2O_2-NH_4Br$,
 25 comparado com a atividade de $H_2O_2-NH_4Br$ e H_2O_2 apenas, contra *P. aeruginosa* na polpa semi líquida com um tempo de tratamento de 18 horas é mostrado na figura 3. A concentração LP foi de 200 ppm. A concentração NH_4Br foi 1000 ppm para ambos os sistemas $LP-H_2O_2-NH_4Br$ e $H_2O_2-NH_4Br$
 30 e a concentração H_2O_2 foi variada como mostrado. A figura 3 mostra que o sistema $LP-H_2O_2-NH_4Br$ produziu uma redução de log maior do que 5,8 logs dentro de 18 horas quando a concentração de H_2O_2 foi de 5 ppm ou acima. A adição de LP dramaticamente aumentou a atividade do sistema como
 35 comparado com a atividade de $H_2O_2-NH_4Br$ sem a enzima ou H_2O_2 sozinho. Os resultados do sistema $LP-H_2O_2-NH_4Br$ em polpa semi líquida foram consistentes com àquelas obtidas

no tampão fosfato (em Exemplo 1).

Um procedimento teste similar foi realizado para comparar a atividade antibacteriana de um sistema LP-H₂O₂-KI, comparado com a atividade de H₂O₂-KI, e H₂O₂ apenas contra *P. aeruginosa* na polpa semi-líquida com um tempo de tratamento de 30 minutos. A concentração LP foi 200 ppm. A concentração KI foi de 1000 ppm para ambos os sistemas LP-H₂O₂-KI e o H₂O₂-KI. A figura 4 mostra que o sistema LP-H₂O₂-KI produziu uma atividade forte em um tempo curto e concentrações de peróxido inferiores (1 -2 ppm) do que o sistema LP-H₂O₂-NH₄Br.

Exemplo 3: Eficácia de perborato, percarbonato, e peróxido de carbamida como oxidantes, em um sistema antimicrobiano LP.

Para testar a eficácia de perborato de sódio, percarbonato de sódio, e peróxido de carbamida para a produção da atividade antibacteriana nos sistemas LP, NH₄Br foi utilizado como um doador de elétron.

Os oxidantes, LP, e NH₄Br foram adicionados separadamente na polpa semi-líquida. O procedimento de teste foi o mesmo que aquele descrito no Exemplo 2. As figuras 5, 6 e 7 ilustram as atividades antibacterianas dos sistemas LP com perborato (NaBO₃), percarbonato (NaPerC), e peróxido de carbamida (CP) como oxidante. A figura 5 mostra a atividade antibacteriana do sistema LP-NaBO₃-NH₄Br, comparado com a atividade de NaBO₃-NH₄Br sozinho contra *P. aeruginosa* em uma polpa semi-líquida com um tempo de tratamento de 18 horas. A concentração de LP foi de 200 ppm e a concentração de NH₄Br foi de 1000 ppm. A concentração de NaBO₃ foi variada como mostrado. A figura 6 mostra a atividade antibacteriana do sistema LP-NaPerC-NH₄Br, comparado com a atividade de NaPerC-NH₄Br sozinho contra *P. aeruginosa* na polpa semi-fluida com um tempo de tratamento de 18 horas. A concentração de LP foi de 200 ppm e a concentração de NH₄Br foi de 1000 ppm. A concentração de NaPerC foi variada como mostrado. A figura 7 mostra a atividade antibacteriana do sistema LP-

CP-NH₄Br, comparada com a atividade de CP sozinho contra *P. aeruginosa* na polpa semi-líquida com um tempo de tratamento de 24 horas. A concentração de LP foi de 2 ppm e a concentração de NH₄Br foi de 60 ppm. A concentração de CP foi variada como mostrado. O sistema com perborato e percarbonato produziu níveis similares de atividade quando comparado com a do sistema com peróxido de hidrogênio, mas em uma concentração de oxidante maior. Para os sistemas LP-NaBO₃-NH₄Br e LP-NaPerC-NH₄Br, a atividade iniciada para mostrar até 10 ppm de perborato e percarbonato (Figuras 5 e 6), enquanto a atividade iniciada com 5 ppm de H₂O₂ para o sistema de LP-H₂O₂-NH₄Br (figura 3). Isto pode ser explicado pelo fato de que o percarbonato de sódio contém apenas cerca de 25% de peróxido de hidrogênio em peso. O sistema de LP-CP-NH₄Br iniciado para gerar forte atividade em 1 - 2 ppm de peróxido de carbamida (Figura 7). O sistema LP-CP-NH₄Br usa uma concentração de oxidante muito baixa para produzir uma atividade mais forte do que qualquer um dos outros três sistemas, denominados LP-NaBO₃-NH₄Br (figura 5), LP-NaPerC-NH₄Br (figura 6), e LP-H₂O₂-NH₄Br (figura 3). Isto ocorre porque concentrações muito baixas de LP (2 ppm) e NH₄Br (60 ppm) foram usadas no sistema LP-CP-NH₄Br, mais do que nos outros três sistemas, onde 200 ppm de LP e 1000 ppm de NH₄Br foram utilizados. As concentrações de LP e NH₄Br, em outros três sistemas não foram otimizadas, assim a quantidade em excesso de LP e NH₄Br poderia consumir uma porção de H₂O₂ nos sistemas. O exemplo 4 a seguir discutirá a otimização dos sistemas LP.

Exemplo 4: Concentrações ótimas dos componentes dos sistemas LP por adição separada.

Para determinar a concentração ótima de cada um dos componentes no sistema LP-H₂O₂-NH₄Br. A concentração de um dos componentes foi alterada enquanto mantinha-se a concentração dos outros dois componentes em uma quantidade em excesso. Por exemplo, para determinar a

concentração ótima de lactoperoxidase, a concentração H_2O_2 foi mantida em 5 ppm e a concentração de NH_4Br em 1000 ppm enquanto muda a concentração de LP de 0,1 para 200 ppm. Para determinar a concentração ótima de NH_4Br , a
5 concentração de H_2O_2 foi mantida em 5 ppm e a concentração de LP em 200 ppm enquanto muda a concentração de NH_4Br de 1 para 200 ppm. Para determinar a concentração ótima de H_2O_2 , a concentração de NH_4Br foi mantida em 100 ppm e a concentração de LP em 1 ppm, enquanto muda a concentração
10 de H_2O_2 de 0,1 a 5 ppm. O procedimento teste para avaliar a eficácia antibacteriana do sistema LP está descrita nos Exemplos 1 e 2.

Os dados no exemplo 2 indicam que o sistema antimicrobiano de LP- H_2O_2 - NH_4Br alcançou uma redução de
15 log maior do que 5,5 de *Ps. Aeruginosa* quando proveu 200 ppm de LP, 5 ppm de H_2O_2 , e 1000 ppm de NH_4Br na combinação. Assumiu-se que todos os três componentes (especialmente LP e NH_4Br) no sistema oram em uma quantidade excessiva durante a avaliação prévia. Para
20 determinar a concentração mínima efetiva (para produzir uma redução de log >5) de cada um dos componentes individualmente, a concentração em que os componentes foi variados enquanto se mantinha os outros dois componentes em excesso na combinação, como descrito acima. A figura 8
25 mostrou a atividade antibacteriana do sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br versus a concentração de LP. No teste, as concentrações de H_2O_2 (5 ppm) e de NH_4Br (1000 ppm) foram mantidos em excesso, enquanto a concentração de LP foi variada de 0,1 ppm para 200 ppm. Os dados na figura 8
30 indicam que o sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br resultou em uma redução maior do log de 5 enquanto a concentração de LP foi igual ou acima de 0,2 ppm. Em 0,1 ppm de LP o sistema conseguiu 4,4 los de redução. Portanto, foi concluído que a concentração mínima efetiva de LP para conseguir uma
35 redução de log >5 é de 0,2 ppm. Similarmente, foi determinado que a concentração mínima efetiva de NH_4Br foi de 50 ppm (Figura 9. Aumentos adicionais na

concentração de NH_4Br além de 50 ppm não resultam em uma melhora significativa na eficácia do sistema. Também, a concentração mínima efetiva para conseguir uma redução de log de >5 para H_2O_2 , foi encontrada como sendo de 0,5 ppm como ilustrado na figura 10. Aumentos adicionais na concentração de H_2O_2 , acima de 0,5 ppm falharam quanto a melhora da atividade do sistema. A concentração mínima efetiva para os componentes individuais foi considerada como uma concentração inferior na combinação para conseguir uma atividade máxima do sistema. Aumentos adicionais na concentração além da concentração mínima efetiva não auxiliaria na melhora da atividade antibacteriana do sistema, significativamente, e assim, considerada em excesso.

As figuras 8, 9 e 10 demonstram que as concentrações mínimas efetivas para se conseguir uma redução > 5 logs para cada componente individualmente denominados LP, H_2O_2 , e NH_4Br são 0,2, 0,5, e 50 ppm, respectivamente. Estas concentrações mínimas efetivas para os componentes individualmente são derivadas por manter os outros dois componentes em excesso na combinação durante os testes. A partir da tabela 1, a combinação ótima para o sistema encontrado foi de $\text{LP} = 1 \text{ ppm} / \text{H}_2\text{O}_2 = 1 \text{ ppm} / \text{NH}_4\text{Br} = 40 \text{ ppm}$. Com as concentrações ótimas combinadas, o sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br resultando em uma redução $> 5,5$ logs. A proporção de três componentes para este sistema foi $\text{LP}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{Br} = 1:1:40$ em peso. Várias outras combinações na Tabela 1 podem ser também consideradas como uma combinação ótima. Elas são (1) $\text{LP}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{Br} = 0,5:0,5:60$; (2) $\text{LP}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{Br} = 0,5:1:60$

Tabela 1

Atividade antibacteriana do sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br contra *P. aeruginosa* na polpa semi-líquida em várias combinações de concentrações (tempo de tratamento de 18 horas).

Combinação dos três componentes (adição separada)			Redução de log
LP (ppm)	H_2O_2 (ppm)	NH_4Br (ppm)	
0,2	0,5	20	0,0

0,2	0,5	40	0,06
0,2	0,5	50	1,10
0,2	0,5	60	1,11
0,2	0,5	80	1,36
0,5	0,5	20	0,30
0,5	0,5	40	2,91
0,5	0,5	50	3,42
0,5	0,5	60	> 5,5
0,5	0,5	80	> 5,5
0,5	1	20	0,00
0,5	1	40	2,51
0,5	1	50	3,87
0,5	1	60	> 5,5
0,5	1	80	> 5,5
1	1	20	4,63
1	1	40	> 5,5
1	1	50	> 5,5
1	1	60	> 5,5
1	1	80	> 5,5
1	2	20	2,04
1	2	40	4,58
1	2	50	> 5,5
1	2	60	> 5,5
1	2	80	> 5,5

Exemplo 5:

O sistema antimicrobiano LP por pré-mistura

Os sistemas antimicrobianos LP pode ser produzido *in situ* por adição dos componentes separadamente para aplicação no sítio. Alternativamente, os sistemas LP podem ser produzidos por pré-mistura de todos os componentes em uma solução concentrada. A solução misturada pode então ser aplicada ao sítio para ser tratado. O exemplo a seguir mostra a produção de um sistema LP-H₂O₂-NH₄Br por pré-mistura.

Uma solução pré-misturada típica de LP-H₂O₂-NH₄Br foi preparada como a seguir. 0,05 g de LP e 0,5 g de NH₄Br foram adicionados em uma garrafa de vidro de 28,35 g (1-oz). 10 ml de água DI foram adicionados à garrafa para dissolver todos os conteúdos. Então, 0,5 g de 30% de H₂O₂

foram adicionados á garrafa para fazer uma solução contendo os 3 componentes misturados juntos. Esta solução misturada contida (p/v) de 0,5% de LP, 1,5% de H_2O_2 e 5% de NH_4Br . A proporção em peso desta solução foi 1:3:10 como LP: H_2O_2 : NH_4Br . As soluções misturadas com outras proporções e concentrações foram preparadas conseqüentemente. Imediatamente após a solução ter feita (considerada como 0 hora), 10 μ l da solução misturada acima foi adicionada para 10 ml da polpa semi líquida para uma determinada concentração final na polpa semi líquida de 5 ppm de LP, 15 ppm de H_2O_2 , e 50 ppm de NH_4Br . Um teste microbiológico foi conduzido usando o procedimento descrito no Exemplo 2, e o teste antibacteriano para a solução misturada foi repetido em 1, 2, 4, 6 e 8 horas após mistura.

De modo a testar até quando a eficácia de uma mistura LP/ H_2O_2 / NH_4Br pode segurar em uma solução aquosa, os três componentes foram misturados juntos em água DI e as soluções misturadas foram testadas para a atividade antibacteriana na polpa semi-líquida em tempos diferentes após a mistura. A mistura foi testada em três diferentes proporções de peso como LP: H_2O_2 : NH_4Br = (1) 1:1:40, (2) 1:1:10, (30) 1:3:10. Para cada proporção, existe uma mistura de alta concentração e uma mistura de concentração baixa (tabela 2). Os resultados da atividade antibacteriana das soluções misturadas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2

Atividade bactericida da solução misturada de LP/ H_2O_2 / NH_4Br versus o tempo após a mistura (testado na polpa semi líquida contra *P. aeruginosa*).

Proporção	Concentrações de componentes em soluções misturadas	Redução de Log em tempos diferentes após a mistura					
		0 hora	1 hora	2 hora	4 hora	6 hora	8 hora

1:1:40	0,5% LP/0,5% H ₂ O ₂ /20% NH ₄ Br (H*)	0	0	0	0	0	0
	0,1% LP/0,1% H ₂ O ₂ /4% NH ₄ Br (L*)	0	0	0	0	0	0
1:1:10	0,5% LP/0,5% H ₂ O ₂ /5% NH ₄ Br (H)	0	0	0	0	0	0
	0,05% LP/0,05% H ₂ O ₂ /0,5% NH ₄ Br (L*)	2,5	0	0	0	0	0
1:3:10	0,5% LP/1,5% H ₂ O ₂ /5% NH ₄ Br (H)	> 5	>5	3,46	3,46	3,37	3,18
	0,05% LP/0,15% H ₂ O ₂ /0,5% NH ₄ Br (L)	> 5	3,40	3,82	2,90	2,85	2,63

A concentração final dos componentes individuais na polpa semi-líquida são como a seguir:

(1) proporção de 1:1:40 - LP = 10 ppm; H₂O₂ = 10 ppm; NH₄Br = 400 ppm.

5 (2) proporção de 1:1:10 - LP = 10 ppm; H₂O₂ = 10 ppm; NH₄Br = 100 ppm.

(3) proporção de 1:3:1 - LP = 5 ppm; H₂O₂ = 15 ppm; NH₄Br = 50 ppm.

* (H) - mistura de alta concentração. (L) - mistura de
10 baixa concentração.

Foi descoberto que a proporção dos componentes é crítica para manter uma atividade antibactericida estável na solução misturada após a mistura dos três componentes juntos. A concentração individual dos componentes
15 individuais na mistura foi descoberta como não sendo

importante. Ambas, a alta e a baixa concentração das misturas em uma proporção de 1:3:10 mantida em uma atividade antibacteriana relativamente forte por pelo menos 8 horas após a mistura. Os dados prévios no Exemplo 4 indicaram que 1:1:40 é a melhor proporção quando os componentes individuais são adicionados à polpa semi-líquida separadamente. Entretanto, foi descoberto que a proporção 1:1:40 não é efetiva quando os três componentes são pré-misturados juntos e então aplicados como uma mistura para o sistema teste. Um aumento de H₂O₂ para a proporção 1:3:10 foi preferida em uma solução de pré-mistura para manter uma atividade preferida estável.

Exemplo 6:

Atividade antimicrobiana da LP-NH₄Br-glicose oxidase (GO)/glicose em um substrato de polpa por adição separada contra *Pseudomonas aeruginosa*.

A eficácia antibacteriana de um sistema LP-NH₄Br-glicose oxidase (GO)/glicose foi determinada pelos procedimentos de teste a seguir: 0,04 g de glicose foi adicionada a 10 ml de substrato de polpa estéril em uma garrafa de vidro de 14,17 g (1/2-oz) para prover uma 0,4% (p/v) de glicose no sistema de teste. 100 ppm de NH₄Br e 5 ppm de LP foram adicionados a 10 ml do substrato de polpa. Finalmente, GO foi adicionado à polpa semi-líquida em várias concentrações de 2,5 unidades/l a 5, 10, 20, 40, 50, 100 e 200 unidades/L. O mesmo procedimento foi realizada para testar o sistema GO-glicose, exceto que NH₄Br e LP não foram adicionados à polpa semi-líquida. Após todas as adições, o conteúdo foi misturado perfeitamente e o inóculo bacteriano de *P. aeruginosa* foi introduzido às garrafas para resultar em uma concentração de cerca de 3×10^7 células/ml. Em 24 horas após a inoculação, 1,0 ml do conteúdo foi tomado de cada garrafa e plaqueado em água nutriente em diluições de 10^{-2} , 10^{-3} , e 10^{-4} usando uma solução de desativação de biocida como as diluições de interesse. Todas as placas foram incubadas a 37°C durante 2 - 3 dias e então as colônias

nas placas foram contadas. A porcentagem de morte e a redução do log foram calculadas, com base em cfu/ml de controle e da cultura tratada. A cultura controle contendo apenas as células bacterianas em 10 mL da polpa
5 semi-líquida.

O sistema LP-NH₄Br-GO/glicose foi testado em uma polpa semi-líquida por 24 horas com uma concentração fixada de LP, NH₄Br, e glicose e concentrações de GO na faixa de 2,5 a 200 ppm, com os resultados mostrados na tabela 3.

10

Tabela 3

Eficácia versus *P aeruginosa* do sistema LP-NH₄Br-glicose oxidase (GO)/glicose em uma polpa semi-líquida em várias concentrações GO (24 horas de tratamento).

LP (ppm)	NH ₄ Br (ppm)	Glicose (%)	GO (U/L)	Redução de Log
5	100	0,4	2,5	0,07
5	100	0,4	5	2,67
5	100	0,4	10	3,64
5	100	0,4	20	> 5,6
5	100	0,4	40	> 5,6
5	100	0,4	50	> 5,6
5	100	0,4	100	> 5,6
5	100	0,4	200	> 5,6

Com a concentração GO aumentada para 5 e 10 U/L, o
15 sistema produziu atividade antibacteriana (redução de log de 2,6 a 3,6). Com a concentração GO aumentada ainda para 20 U/L ou acima, o sistema resultou em uma atividade antibacteriana forte, produzindo uma redução > 5,6 logs (Tabela 3). Conseqüentemente, para conseguir uma redução
20 > que 5 logs, a concentração GO preferida é de cerca de 20 U/L (equivalente a 0,5 ppm) ou maior.

A comparação da eficácia antibacteriana do sistema LP-NH₄Br-GO/glicose versus GO/gli sozinho é ilustrada na figura 11. Os dois sistemas foram comparados na mesma
25 faixa de concentração GO. Foi descoberto que o sistema LP-NH₄Br-GO/glicose gera a eficácia em 5 U/L de GO, enquanto GO/Gli sozinho requer uma concentração de GO maior (80 U/L) para iniciar a eficácia gerada. Apenas 20 U/L de GO para o sistema LP-NH₄Br-GO/glicose conseguir

uma redução de log > 5, enquanto 200 U/L de GO gera uma redução de log >5 se GO/Gli forem usados sozinhos (Figura 11). O sistema LP-NH₄Br-GO/glicose demonstrou uma atividade antibacteriana muito mais forte do que GO/gli agindo sozinho. Uma vez que o sistema GO/glicose produz apenas H₂O₂ como um agente antimicrobiano, estes resultados sugerem que o sistema LP-NH₄Br-GO/glicose produz compostos antimicrobianos relacionados com bromina mais fortes do que H₂O₂.

Um estudo sobre o tempo de morte para os sistemas LP-NH₄Br-GO/glicose e GO-glicose foi conduzido com o procedimento a seguir: 0,04 g de glicose, 50 ppm de NH₄Br e 2 ppm de LP foram adicionados a 10 ml de substrato de polpa estéril em uma garrafa de vidro de 14,17 g (1/2-oz). Finalmente, 20 unidades/L de GO foram adicionados à polpa semi-líquida. Para o sistema GO/glicose apenas, apenas 0,04 g de glicose e 200 unidades/L de GO foram adicionados a 10 ml de polpa semi líquida. Após todas as adições, o conteúdo foi misturado perfeitamente e a garrafa foi inoculada através da introdução de cerca de 3×10^7 células/ml de *P. aeruginosa*. Em determinados tempos de contatos após a inoculação (de 1 minuto a 5, 10, 20, 30 minutos, e 1 hora, 2 horas, 4, 6, 8 horas e 24 horas), o conteúdo de 1,0 ml foi tomado da cultura tratada e plaqueada em agar nutriente para diluições 10^{-2} , 10^{-3} , e 10^{-4} usando uma solução de desativação de biocida como a diluição de interesse. As placas foram incubadas a 37°C durante 2 - 3 dias. As colônias na placa foram contadas e a porcentagem de morte e a redução de log foram calculados com base no cfu/ml do controle e da cultura tratada.

O sistema LP-NH₄Br-GO/glicose foi testado em uma concentração GO ótima (20 U/L) no substrato de polpa versus tempo de contato (ou tempo de tratamento) para determinar sua proporção de morte. O valor da redução de log foi medido em diferentes tempos de contato após a inoculação. O sistema GO/glicose em GO = 200 U/L foi

incluído para comparação. Os resultados dos testes estão mostrados na Figura 12. Como mostrado na figura, o sistema LP-NH₄Br-GO/glicose demonstrou uma ação de morte rápida, alcançando uma redução de 4 logs em 10 minutos do tempo de contato. O sistema produziu uma redução de log > 5,5 após um tempo de tratamento de 2 horas. O sistema GO/Gli, que gera H₂O₂ como o agente antimicrobiano, mostrou uma proporção de morte muito lenta. O sistema GO/Gli em uma concentração 10 vezes maior de GO (200 vs 20 U/L) apenas rendendo uma redução de 1,0 log após um contato de 2 horas. Ele alcançou o nível de redução de log > 5,5 após um tratamento de 24 horas, que é de 22 horas mais lento do que o sistema LP-NH₄Br-GO/glicose. Os resultados sugerem que os compostos de bromina, tais como bromina e HOBr, gerado a partir do sistema LP-NH₄Br-GO/glicose provê uma proporção de morte muito mais rápida do que o peróxido de hidrogênio gerado a partir do sistema GO/Gli. O sistema LP-NH₄Br-GO/glicose tem uma aplicação potencial como um sanitizante/desinfetante deste comportamento rápido de morte.

Exemplo 7:

Efeito do pH na atividade antimicrobiana do sistema LP-NH₄Br-H₂O₂.

O efeito do pH na atividade antimicrobiana de LP-NH₄Br-H₂O₂ foi determinado como a seguir: LP foi pré-misturado com NH₄Br em água de torneira para formar uma solução. A solução foi então ajustada em valores diferentes de pH com NaOH ou HCl. Este pH ajustado da solução LP/NH₄Br foi então misturado com uma solução H₂O₂ diluída para formar uma solução misturada final que contém todos os três componentes e possui atividade antimicrobiana. A solução misturada final foi adicionada à polpa semi-líquida para resultar nas concentrações desejadas dos componentes para avaliar a atividade antimicrobiana do sistema LP.

Uma preparação típica da solução pré-misturada de LP-NH₄Br-H₂O₂ com pH ajustado pode ser descrita como a seguir: 0,5 grama de NH₄Br e 0,05 grama de LP foram

adicionadas a 50 ml de água de torneira em uma garrafa de vidro de 113,40 (4-oz), e misturada bem para produzir uma solução tendo um pH de 6,95. HCl (1N) foi utilizado para ajustar a solução LP-NH₄Br para um pH 2,92. Em uma

5 garrafa de 113,40 g (4-oz) separada, 0,5 grama de H₂O₂ (30%) foi adicionada a 50 mL de água de torneira para formar uma solução de H₂O₂ (pH ~ 6,5). A solução de H₂O₂ diluída foi lentamente vertida na solução de LP-NH₄Br e

10 misturada gentilmente para produzir uma solução misturada contendo todos os três componentes. A solução misturada final teve um pH de 3,4 e contendo 0,05% de LP, 0,15% de H₂O₂, e 0,5% de NH₄Br. Imediatamente após a mistura de todos os três componentes na solução, 0,2 mL da solução

15 misturada de LP-NH₄Br-H₂O₂ foi adicionada a 10 mL de polpa semi-líquida para resultar 10 ppm de LP, 30 ppm de H₂O₂, e 100 ppm de NH₄Br no substrato de polpa. Os testes antibacterianos foram conduzidos seguindo os procedimentos descritos no Exemplo 1 e os resultados são demonstrados na tabela 4.

20

Tabela 4

Efeito do pH na eficácia antimicrobiana de LP-NH₄Br-H₂O₂ versus *P. aeruginosa* em polpa semi-líquida com um tempo de tratamento de 18 horas.

pH da solução misturada	3,4	4,7	6,1	6,9*	8,2	8,9
Redução de Log (18 horas tratamento)	3,19	2,97	3,17	> 5,7	> 5,7	2,23

* A solução misturada de LP-NH₄Br-H₂O₂ tendo um pH de 6,9

25 foi preparada por mistura de três componentes sem ajuste de pH.

Como mostrado acima, o pH da solução pré-misturada de LP-NH₄Br-H₂O₂ pode ter um efeito na eficácia antimicrobiana do sistema. As melhores condições é a mistura de três

30 componentes em água sem pH ajustado ou ajuste de pH para

uma condição alcalina levemente. O pH da solução pré-misturada sem pH ajustado é em torno de neutro.

Exemplo 8:

5 Comparação da eficácia antimicrobiana de $\text{NaBr}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versus NH_4Br como haleto e fonte de amônio para os sistemas LP.

As atividades antibacterianas dos sistemas LP contendo $\text{NaBr}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como uma fonte de haleto e uma fonte de amônio foram avaliadas em uma polpa semi líquida e comparada com os sistemas LP contendo NH_4Br . Os componentes individuais dos sistemas LP foram adicionados separadamente para a polpa semi-líquida para formar vários sistemas antimicrobianos LP. O procedimento de teste foi similar àquele descrito no Exemplo 2 foi utilizado para a presente avaliação. Uma comparação das atividades antibacterianos dos sistemas LP- H_2O_2 - $\text{NaBr}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versus o sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br contra *Ps. Aeruginosa* em uma polpa semi-líquida é mostrada na tabela 5. Foi descoberto que o sistema LP- H_2O_2 - $\text{NaBr}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ produziu um nível de atividade que foi o mesmo que ou levemente melhor do que a do sistema LP- H_2O_2 - NH_4Br .

Tabela 5

25 Comparação da eficácia bactericida de LP- H_2O_2 - $\text{NaBr}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versus LP- H_2O_2 - NH_4Br em polpa semi líquida contra *Ps. Aeruginosa* (tratamento de 24 horas através de adições separadas).

LP (ppm)	H_2O_2 (ppm)	NaBr (ppm)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ppm)	NH_4Br (ppm)	Redução de Log
1	1	40	40	0	2,54
1	1	50	50	0	> 5,6
1	1	80	80	0	> 5,6
1	1	0	0	40	2,2
1	1	0	0	50	4,0
1	1	0	0	80	> 5,6

Similarmente, $\text{NaBr}/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi comparado com NH_4Br nos sistemas LP-GO/glicose. A tabela 6 mostra as atividades antibacterianas dos sistemas LP-GO/glicose- $\text{NaBr}/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

versus o sistema LP-GO/Gli-NH₄Br contra *Ps. aeruginosa* na polpa semi-líquida através de adições separadas. O sistema LP-GO/gli-NaBr/(NH₄)₂SO₄ produzindo um nível de atividade que foi o mesmo que ou levemente melhor do que a do sistema LP/GO/gli-NH₄Br (tabela 6).

É concluído que a combinação dois sais solúveis em água, denominados, NaBr e (NH₄)₂SO₄ tem a mesma eficácia que ou uma eficácia levemente melhor do que àquele do NH₄Br como uma fonte de haleto e uma fonte de amônio para produção de agentes antimicrobianos nos sistemas LP.

Tabela 6

Comparação da eficácia bactericida de LP-GO/gli-NaBr(NH₄)₂SO₄ na polpa líquida contra *Ps. aeruginosa* (24 horas de tratamento através de adições separadas).

LP (ppm)	GO (ppm)	Glicose (ppm)	NaBr (ppm)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (ppm)	NH ₄ Br (ppm)	Redução de Log
2	1	1000	40	40	0	> 5,6
2	1	1000	50	50	0	> 5,6
2	1	1000	60	60	0	> 5,6
2	1	1000	0	0	40	5,26
2	1	1000	0	0	50	> 5,6
2	1	1000	0	0	60	> 5,6

Os depositantes incorporaram especificamente o conteúdo completo de todas as referências citadas nesta descrição. Adicionalmente, quando uma quantidade, concentração, ou outros valores ou parâmetros é determinado tanto como uma faixa, faixa preferida, ou uma lista de valores máximos preferidos e valores mínimos preferidos, isto deve ser entendido como uma descrição especificamente de todas as faixas formadas a partir de qualquer par de qualquer faixas máximas limite ou valores preferidos e qualquer faixa de limite inferior ou valor preferido, sem levar em consideração se as faixas são descritas separadamente. De modo que uma faixa de valores numéricos foi aqui descrita, a menos que de outro modo declarado, a faixa é pretendido incluir os pontos extremos do mesmo, e todos

os números inteiros e frações dentro da faixa. Não é pretendido que o escopo de invenção esteja limitado aos valores específicos recitados quando definindo uma faixa. Outras configurações da presente invenção serão aparentes aos técnicos no assunto a partir do presente relatório descritivo e da prática da presente invenção descrita aqui. É pretendido que a presente especificação e os exemplos sejam considerados como exemplificativo apenas com o escopo e o espírito de proteção da invenção sendo indicado através das reivindicações e equivalentes definidos a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar o crescimento de pelo menos um microorganismo em um sistema aquoso ou em um substrato, capaz de suportar o crescimento do referido microorganismo, o método caracterizado pelo fato de compreender: prover (a) uma lactoperoxidase, (b) uma fonte de peróxido, (c) um haleto ou um tiocianato, onde o haleto não é uma clorina e, opcionalmente, (d) uma fonte de amônio sob condições onde a lactoperoxidase, o peróxido da fonte de peróxido, o haleto ou o tiocianato e, opcionalmente, o amônio obtido a partir da fonte de amônio, interagem para prover um agente antimicrobiano ao referido sistema aquoso ou ao referido substrato e onde o referido agente antimicrobiano controla o crescimento de pelo menos um microorganismo no sistema aquoso ou no substrato.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase ser obtida a partir de leite de mamífero.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase ser obtida a partir de leite bovino.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de peróxido ser peróxido de hidrogênio.
5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de peróxido ser peróxido de carbamida, percarbonato, perborato ou persulfato, ou combinações destes.
6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de peróxido ser um peróxido de hidrogênio enzimático gerador do sistema que compreende um peróxido de hidrogênio produtor de uma enzima e um substrato de enzima que é reagido pela enzima para produzir o peróxido de hidrogênio.
7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o peróxido de hidrogênio produtor de enzima

ser glicose oxidase e o substrato de enzima ser glicose.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o haleto estar na forma de um sal de haleto de um metal alcalino ou um metal alcalino terroso.

5 9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o haleto ser brometo de amônio, brometo de sódio, brometo de potássio, brometo de cálcio, brometo de magnésio, iodeto de sódio, iodeto de potássio, iodeto de amônio, iodeto de cálcio ou iodeto de magnésio, ou
10 combinações destes.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o haleto ser iodeto de potássio.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1,
15 caracterizado pelo fato de o tiocianato ser tiocianato de sódio, tiocianato de amônio, ou tiocianato de potássio, ou combinações destes.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de amônio ser um sal
20 de amônio.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o haleto e a fonte de amônio serem ambos providos por um haleto de amônio.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1,
25 caracterizado pelo fato de o haleto e a fonte de amônio serem ambos providos por brometo de amônio.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o haleto ser brometo de sódio e a fonte de amônio ser sulfato de amônio.

30 16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o agente antimicrobiano ser provido em um sistema aquoso por adição de lactoperoxidase, fonte de peróxido, haleto ou tiocianato, e fonte de amônio ao sistema aquoso de modo que a
35 lactoperoxidase tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, a fonte de peróxido proveja uma concentração de peróxido de

hidrogênio no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, o haleto ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10,000 ppm, e a fonte de amônio prover um íon de amônio em uma
5 concentração, no sistema aquoso, na faixa de cerca de 0,0 a cerca de 10,000 ppm.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a
10 cerca de 50 ppm, a fonte de peróxido prover uma concentração de peróxido de hidrogênio, no sistema aquoso, na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 200 ppm, o haleto ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 500 ppm, e a fonte de amônio prover
15 um íon de amônio em uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0 a cerca de 500 ppm.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de peróxido ser um peróxido de hidrogênio enzimático gerador do sistema
20 compreendendo glicose oxidase e glicose, onde o haleto e a fonte de amônio são ambos providos por NH_4Br , e onde o agente antimicrobiano é provido em um sistema aquoso por adição de lactoperoxidase, NH_4Br , glicose oxidase e glicose ao sistema aquoso de modo que a lactoperoxidase
25 tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, NH_4Br tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10000 ppm, a glicose oxidase tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01
30 a cerca de 500 ppm e a glicose tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 10,000 ppm.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase ter uma
35 concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 50 ppm, NH_4Br ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 500 ppm, a

glicose oxidase ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,05 a cerca de 50 ppm e a glicose ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 10 ppm a cerca de 5000 ppm.

5 20. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de peróxido ser um peróxido de hidrogênio enzimático gerador do sistema compreendendo glicose oxidase e glicose, onde o haleto é NaBr e a fonte de amônio é $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e onde o agente
10 antimicrobiano é provido em um sistema aquoso por adição de lactoperoxidase, $\text{NaBr}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glicose oxidase e glicose ao sistema aquoso de modo que a lactoperoxidase tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, NaBr tenha uma
15 concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10000 ppm, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10000 ppm, a glicose oxidase tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 500 ppm e a
20 glicose tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 10,000 ppm.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase ter uma
25 concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 50 ppm, NaBr ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 500 ppm, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 500 ppm, a glicose oxidase ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de
30 0,05 ppm a cerca de 50 ppm e a glicose ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 10 ppm a cerca de 5000 ppm.

22. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a fonte de peróxido ser um
35 peróxido de hidrogênio enzimático gerador do sistema compreendendo glicose oxidase e glicose, onde o haleto é KI, e onde o agente antimicrobiano é provido em um

sistema aquoso por adição de lactoperoxidase, KI, glicose oxidase e glicose ao sistema aquoso de modo que a lactoperoxidase tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, KI tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10000 ppm, a glicose oxidase tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 500 ppm e a glicose tenha uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 10,000 ppm.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de a fonte de a lactoperoxidase ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 50 ppm, KI ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 1 a cerca de 500 ppm, a glicose oxidase ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 0,05 ppm a cerca de 50 ppm e a glicose ter uma concentração no sistema aquoso na faixa de cerca de 10 ppm a cerca de 5000 ppm.

24. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o agente antimicrobiano ser provido ao sistema aquoso ou ao substrato por combinação de lactoperoxidase, fonte de peróxido, haleto ou tiocianato e, opcionalmente, uma fonte de amônio com água para formar uma solução concentrada na qual a lactoperoxidase, peróxido a partir da fonte de peróxido, o haleto e, opcionalmente, o amônio a partir da fonte de amônio interagir para prover um agente antimicrobiano na solução concentrada e então aplicar a solução concentrada ao sistema aquoso ou ao substrato.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a solução concentrada compreender a lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, NH_4Br em uma concentração na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração na faixa de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em

peso, com base no peso da solução concentrada.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a solução concentrada compreender lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,05% em peso a cerca de 0,5% em peso, NH_4Br em uma concentração na faixa de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso, e H_2O_2 em uma concentração na faixa de cerca de 0,15% em peso a cerca de 1,5% em peso, com base no peso da solução concentrada.
27. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e NH_4Br estarem presentes na solução concentrada em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:1:5 a cerca de 1:10:100.
28. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e NH_4Br estarem presentes na solução concentrada em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:3:10.
29. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a solução concentrada compreender lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, NaBr em uma concentração na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma concentração na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração na faixa de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em peso, com base no peso da solução concentrada.
30. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a solução concentrada compreender lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,05% em peso a cerca de 5% em peso, NaBr em uma concentração na faixa de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma concentração na faixa de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso, e H_2O_2 em uma concentração na faixa de cerca de 0,15% em peso a cerca de 1,5% em peso, com base no peso da solução

concentrada.

31. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , NaBr, e $(NH_4)_2SO_4$ estarem presente na solução concentrada em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:1:5:5 a cerca de 1:10:100:100.

32. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , NaBr, e $(NH_4)_2SO_4$ estarem presente na solução concentrada em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:3:10:10.

33. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a solução concentrada compreender lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, KI em uma concentração na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração na faixa de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em peso, com base no peso da solução concentrada.

34. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a solução concentrada compreender lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, KI em uma concentração na faixa de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração na faixa de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em peso, com base no peso da solução concentrada.

35. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e KI estarem presentes na solução concentrada em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:1:5 a cerca de 1:10:100.

36. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e KI estarem presentes na solução concentrada em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:1:5 a cerca de 1:3:10.

37. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o agente antimicrobiano ser provido em um sistema aquoso ou em um substrato através

da adição de lactoperoxidase, fonte de peróxido, haleto ou tiocianato e, opcionalmente, a fonte de amônio, separadamente do sistema aquoso e do substrato sob condições nas quais o agente antimicrobiano seja formado
5 *in situ* no sistema aquoso ou no substrato.

38. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o sistema aquoso ser um sistema de trabalho em metal, um sistema de água de resfriamento, um sistema de água residual, um sistema de
10 processamento de alimento, um sistema de água potável, um sistema de água de processamento de couro, um sistema de água pura, um sistema de preparo de papel ou um sistema de processamento de papel.

39. Método, de acordo com a reivindicação 1,
15 caracterizado pelo fato de o controle do crescimento de microorganismos em um sistema aquoso ser realizado através da provisão do agente antimicrobiano na entrada de água de um sistema de trabalho em metal, um sistema de água de resfriamento, um sistema de água residual, um
20 sistema de processamento de alimento, um sistema de água potável, um sistema de água de processamento de couro, um sistema de água pura para um sistema de preparo de papel, um sistema para fazer papel ou um sistema de processamento de papel.

25 40. Método para matar ou inibir o crescimento de microorganismos em um sistema aquoso ou em um substrato, capaz de suportar o crescimento dos microorganismos, o método caracterizado pelo fato de compreender: um primeiro recipiente solúvel em água contendo, na forma
30 sólida, uma lactoperoxidase, um haleto ou um tiocianato, onde o haleto não é um cloreto, opcionalmente, uma fonte de amônio, e um substrato enzimático de uma enzima que tem a propriedade de agir no substrato enzimático para produzir o peróxido de hidrogênio; prover um segundo
35 recipiente solúvel em água contendo, na forma sólida, uma enzima que tem a propriedade de agir no substrato enzimático para produzir o peróxido de hidrogênio;

adicionar o primeiro recipiente solúvel em água e no segundo recipiente solúvel em água, a água sob condições nas quais a enzima tenha propriedade para agir no substrato enzimático, para produzir o peróxido de hidrogênio, agir no substrato enzimático para produzir peróxido de hidrogênio e onde a lactoperoxidase, o peróxido de hidrogênio, o haleto e, opcionalmente, o amônio obtido a partir de uma fonte de amônio, interajam para formar um agente antimicrobiano; e prover o agente antimicrobiano em um sistema aquoso ou em um substrato e sendo que o agente antimicrobiano inibe o crescimento dos microorganismos no sistema aquoso ou no substrato.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de a etapa de adicionar o primeiro recipiente solúvel em água e o segundo recipiente solúvel em água a água sob condições nas quais a enzima que tem a propriedade de agir no substrato enzimático, para produzir o peróxido de hidrogênio, age no substrato enzimático para produzir o peróxido de hidrogênio e sendo que a lactoperoxidase, o peróxido de hidrogênio, o haleto e, opcionalmente, o amônio obtido de uma fonte de amônio, interagem para formar um agente antimicrobiano, dita etapa sendo realizada através das etapas de:

- dissolver o primeiro recipiente solúvel em água em água para formar uma primeira solução concentrada contendo uma lactoperoxidase, um haleto ou um tiocianato, opcionalmente, uma fonte de amônio, e um substrato enzimático de um sistema produtor de peróxido de hidrogênio enzimático;

- dissolver o segundo recipiente solúvel em água em água para formar uma segunda solução concentrada contendo uma enzima que tem a propriedade de agir no substrato enzimático para produzir peróxido de hidrogênio, de modo que a segunda solução concentrada não esteja em contato com a primeira solução concentração e, então;

- adicionar a primeira solução concentrada e a segunda

solução concentrada, separadamente, ao sistema aquoso ou a um substrato para ser tratado sob condições onde o agente antimicrobiano seja formado *in situ* no sistema aquoso ou no substrato.

- 5 42. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de a enzima que tem a propriedade de agir sob um substrato enzimático para produzir o peróxido de hidrogênio ser glicose oxidase e o substrato enzimático é glicose.
- 10 43. Composição, caracterizada pelo fato de compreender lactoperoxidase, uma fonte de peróxido, um haleto ou um tiocianato, onde o haleto não é um cloreto e, opcionalmente uma fonte de amônio.
- 15 44. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de a fonte de peróxido ser peróxido de hidrogênio.
45. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de a fonte de peróxido ser peróxido de carbamida, percarbonato, perborato ou persulfato, ou combinações destes.
- 20 46. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de a fonte de peróxido ser um sistema gerador de peróxido de hidrogênio enzimático que compreende um peróxido de hidrogênio produtor de enzima e
- 25 um substrato enzimático que é reagido através da enzima para produzir o peróxido de hidrogênio.
47. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o peróxido de hidrogênio produtor de enzima ser glicose oxidase e o substrato
- 30 enzimático ser glicose.
48. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o haleto estar na forma de um sal de haleto de um metal alcalino ou de um metal alcalino terroso.
- 35 49. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o haleto ser brometo de amônio, brometo de sódio, brometo de potássio, brometo de

cálcio, brometo de magnésio, iodeto de sódio, iodeto de potássio, iodeto de amônio, iodeto de cálcio, ou iodeto de magnésio, ou combinações destes.

50. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o haleto ser iodeto de potássio.

51. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o tiocianato ser tiocianato de sódio, tiocianato de amônio, ou tiocianato de potássio, ou combinações destes.

52. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de a fonte de amônio ser um sal de amônio.

53. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o haleto e a fonte de amônio serem ambos providos através do haleto de amônio.

54. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o haleto e a fonte de amônio serem ambos providos por brometo de amônio.

55. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de o haleto ser brometo de sódio e a fonte de amônio ser sulfato de amônio.

56. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, uma fonte de peróxido que provê peróxido de hidrogênio em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, um haleto em uma concentração na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10,000 ppm, e uma fonte de amônio opcional que provê um íon de amônio em uma concentração na faixa de cerca de 0,0 a cerca de 10,000 ppm.

57. Composição, caracterizada pelo fato de compreender uma lactoperoxidase e um brometo de amônio.

58. composição, caracterizada pelo fato de compreender lactoperoxidase, brometo de sódio, e sulfato de amônio.

59. composição, de acordo com a reivindicação 54,

caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo uma lactoperoxidase em uma concentração de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, NH_4Br em uma concentração de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em peso com base no peso da referida composição.

60. Composição, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração de cerca de 0,05% em peso a cerca de 0,5% em peso, NH_4Br em uma concentração de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso, e H_2O_2 em uma concentração de cerca de 0,15% em peso a cerca de 1,5% em peso, com base no peso da referida composição.

61. Composição, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e NH_4Br , estarem presentes em uma proporção em peso de cerca de 1:1:5 a cerca de 1:10:100.

62. Composição, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e NH_4Br , estarem presentes em uma proporção em peso de cerca de 1:3:10.

63. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, NaBr em uma concentração de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma concentração de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração de cerca de 0,03% a cerca de 15% em peso, com base no peso total da referida composição.

64. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração de cerca de 0,05% em peso a cerca de 0,5% em peso, NaBr em uma concentração de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em

peso, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma concentração de cerca de 0,5% em peso a cerca de 5% em peso, e H_2O_2 em uma concentração de cerca de 0,15% a cerca de 1,5% em peso, com base no peso total da referida composição.

5 65. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , NaBr e $(\text{NH}_4\text{B})_2\text{SO}_4$ estarem presentes em uma proporção em peso de cerca de 1:1:5:5 a cerca de 1:10:100:100.

10 66. Composição, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , NaBr e $(\text{NH}_4\text{B})_2\text{SO}_4$ estarem presentes em uma proporção em peso de cerca de 1:3:10:10.

15 67. Composição, de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração de cerca de 0,01% em peso a cerca de 5% em peso, KI em uma concentração de cerca de 0,1% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração de cerca de 0,03% em peso a cerca de 15% em peso, com base no peso da referida
20 composição.

68. Composição, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração de cerca de 0,05% em peso a cerca de 0,5% em peso, KI em uma
25 concentração de cerca de 0,5% em peso a cerca de 50% em peso, e H_2O_2 em uma concentração de cerca de 0,15% em peso a cerca de 1,5% em peso, com base no peso da referida composição.

30 69. Composição, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e KI estarem presentes em uma proporção em peso de cerca de 1:1:5 a cerca de 1:10:100.

70. Composição, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de a lactoperoxidase, H_2O_2 , e KI
35 estarem presentes em uma proporção em peso de cerca de 1:3:10.

71. Composição, de acordo com a reivindicação 43,

caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, NH_4Br em uma concentração na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10,000 ppm, glicose oxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 500 ppm e glicose em uma concentração na faixa de cerca de 1 a cerca de 10,000 ppm.

72. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, NaBr em uma concentração na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10,000 ppm, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma concentração na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10,000 ppm, glicose oxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 500 ppm e glicose em uma concentração na faixa de cerca de 1 a cerca de 10,000 ppm.

73. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de compreender um sistema aquoso contendo lactoperoxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1000 ppm, KI em uma concentração na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10,000 ppm, glicose oxidase em uma concentração na faixa de cerca de 0,01 a cerca de 500 ppm e glicose em uma concentração na faixa de cerca de 1 a cerca de 10,000 ppm.

74. Composição, de acordo com a reivindicação 47, caracterizada pelo fato de a composição ser mantida em uma forma, substancialmente, não-reagida, por um período de tempo, pela manutenção da glicose oxidase separada fisicamente da lactoperoxidase, glicose, haleto ou tiocianato e uma ótima fonte de amônio.

75. Composição, de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de a glicose oxidase ser mantida sob condição anaeróbica.

76. Composição, de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de a lactoperoxidase, glicose,

haletos ou tiocianatos, e uma ótima fonte de amônio serem mantidos, em um recipiente solúvel em água e, a glicose oxidase ser mantida em um segundo recipiente solúvel em água ou onde a lactoperoxidase, a glicose, a glicose oxidase, o haletos ou o tiocianatos, e uma ótima fonte de amônio estejam contidos em um recipiente que tem pelo menos um compartimento separado de modo que a glicose oxidase esteja fisicamente separada da lactoperoxidase, glicose, haletos ou tiocianatos, e da ótima fonte de amônio.

77. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de conter a glicose oxidase, lactoperoxidase, brometo de amônio e glicose em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:1:10:10 a cerca de 1:5:100:5000.

78. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de conter a glicose oxidase, lactoperoxidase, brometo de sódio, sulfato de amônio e glicose em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:1:10:10:100 a cerca de 1:5:100:100:5000.

79. Composição, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de conter a glicose oxidase, lactoperoxidase, iodeto de potássio e glicose em uma proporção em peso na faixa de cerca de 1:1:10:10 a cerca de 1:5:100:5000.

80. Método para controlar o crescimento de pelo menos um microorganismo, em ou no produto, material, ou em um meio suscetível ao ataque por um microorganismo, o método caracterizado pelo fato de compreender adicionar ao produto, ao material, ou ao meio a composição definida na reivindicação 43.

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de o material ou o meio estar na forma de um sólido, uma dispersão, uma emulsão, ou uma solução.

1/6

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ENTRE LP-H₂O₂-KI, LP-H₂O₂-NH₄Br,
LP-H₂O₂-NaBr, e LP-H₂O₂-NaSCN vs
P. aeruginosa

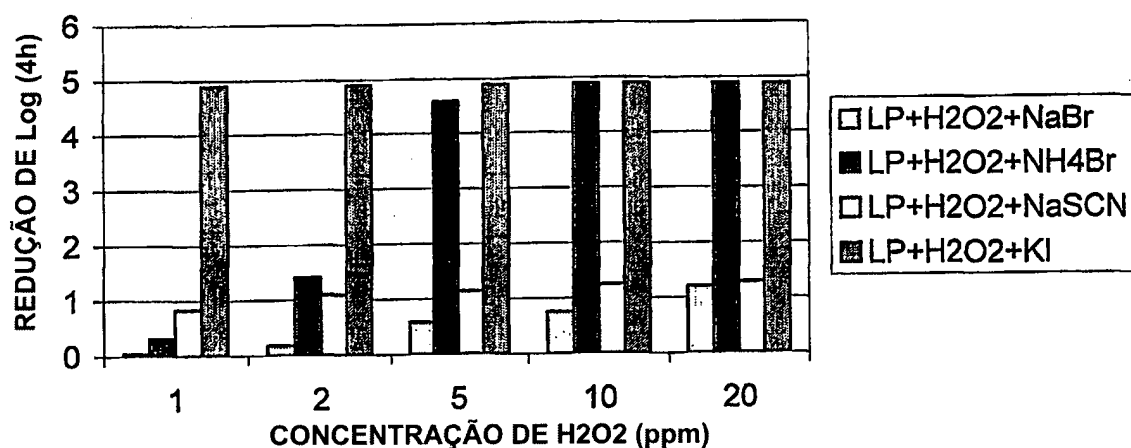


FIG.1

COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
ENTRE LP-H₂O₂-NH₄Br, H₂O₂-NH₄Br e SOMENTE H₂O₂ vs
P. aeruginosa

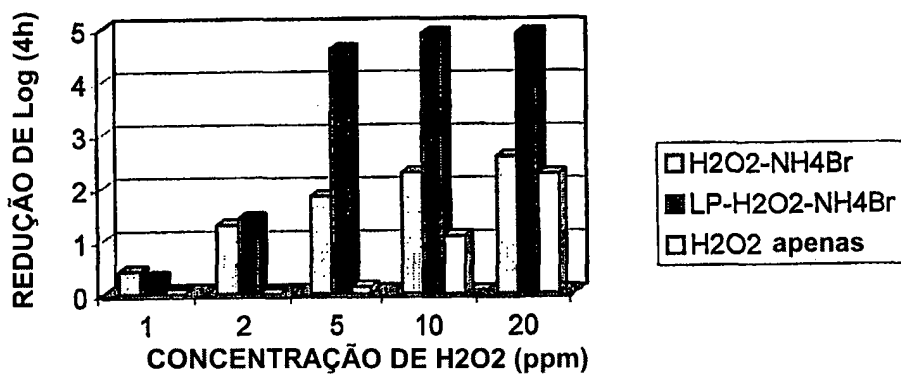


FIG.2

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ENTRE LP-H₂O₂-NH₄Br,
H₂O₂-NH₄Br, e H₂O₂ APENAS EM UM SUBSTRATO
DE POLPA CONTRA *P. aeruginosa*
(18 HORAS DE CONTATO)

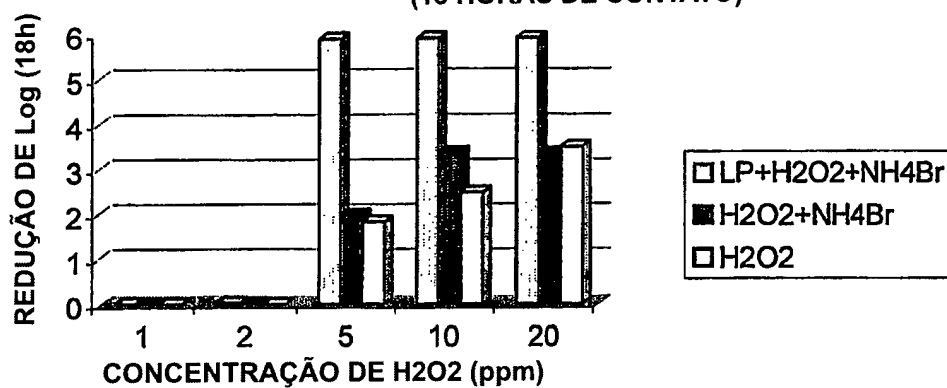


FIG.3

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ENTRE LP-H₂O₂-KI,
H₂O₂-KI, e H₂O₂ APENAS EM UM SUBSTRATO
DE POLPA CONTRA *P. aeruginosa*
(30 MINUTOS DE CONTATO)

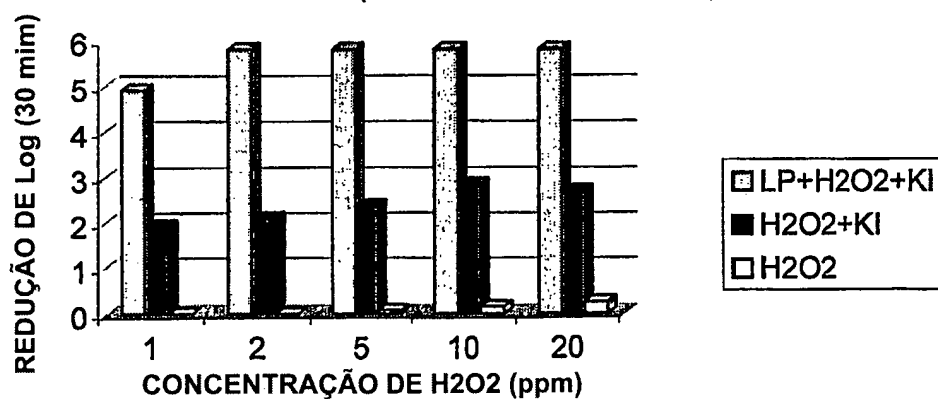


FIG.4

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ENTRE LP-NaBO₃-NH₄Br e
NaBO₃-NH₄Br EM UM SUBSTRATO
DE POLPA CONTRA *P. aeruginosa*
(18h DE CONTATO)

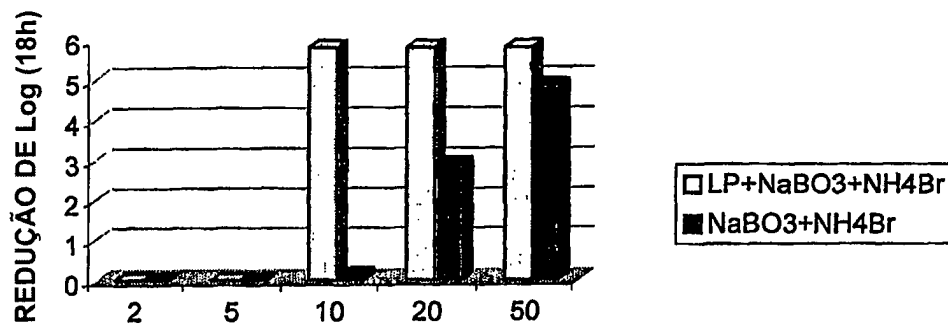


FIG.5

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ENTRE LP-NaPerC-NH₄Br e
NaPerC-NH₄Br EM UM SUBSTRATO
DE POLPA CONTRA *P. aeruginosa*
(18h DE CONTATO)

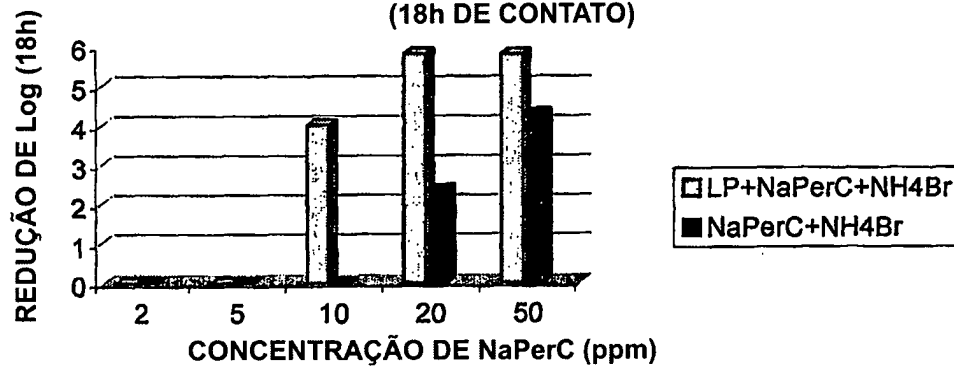


FIG.6

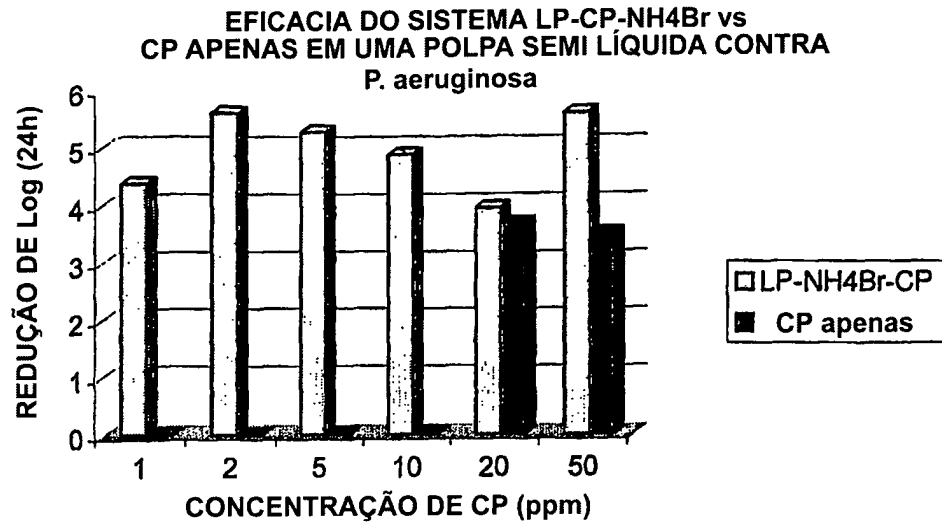


FIG.7

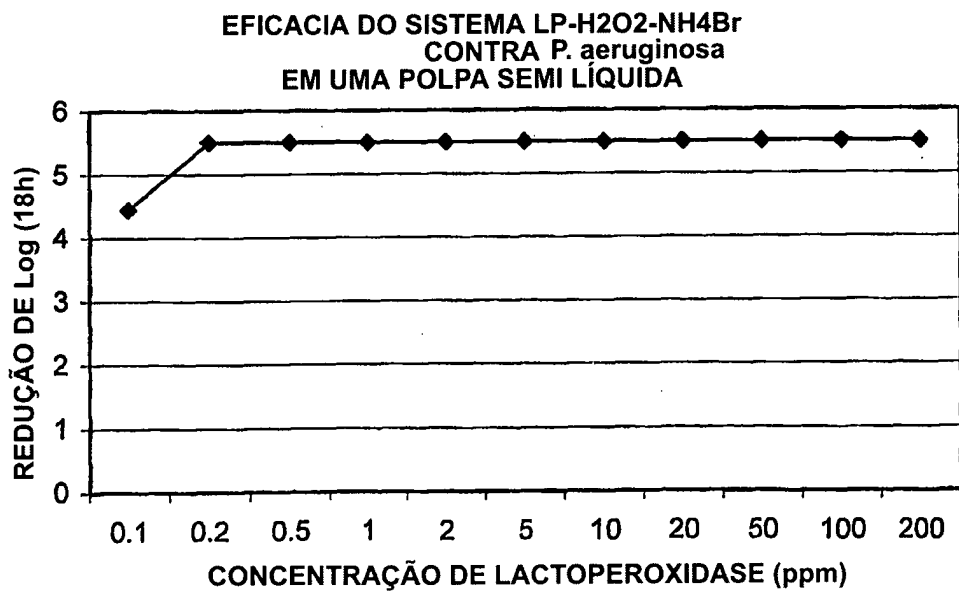


FIG.8

5/6

AÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NH_4Br
SOBRE A EFICÁCIA DO SISTEMA
LP-H2O2- NH_4Br vs. *P. aeruginosa*
EM POLPA SEMI LÍQUIDA

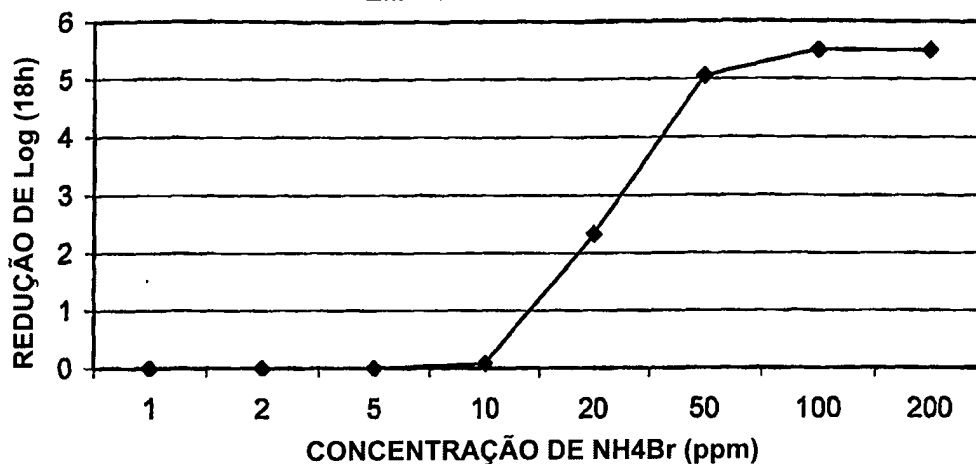


FIG.9

AÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE H_2O_2
SOBRE A EFICÁCIA DO SISTEMA
LP-H2O2- NH_4Br vs. *P. aeruginosa*
EM POLPA SEMI LÍQUIDA

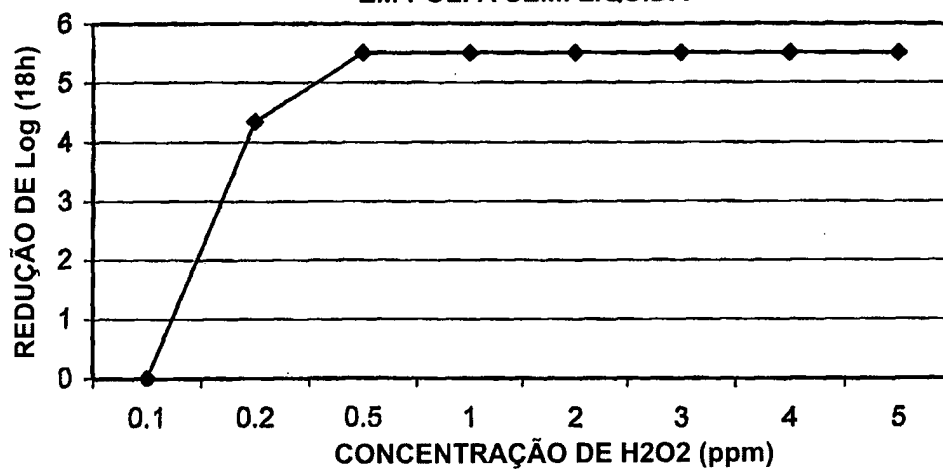


FIG.10

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ENTRE LP-NH₄Br-GO/gli E
GO/gli EM POLPA SEMI LÍQUIDA vs
P. aeruginosa

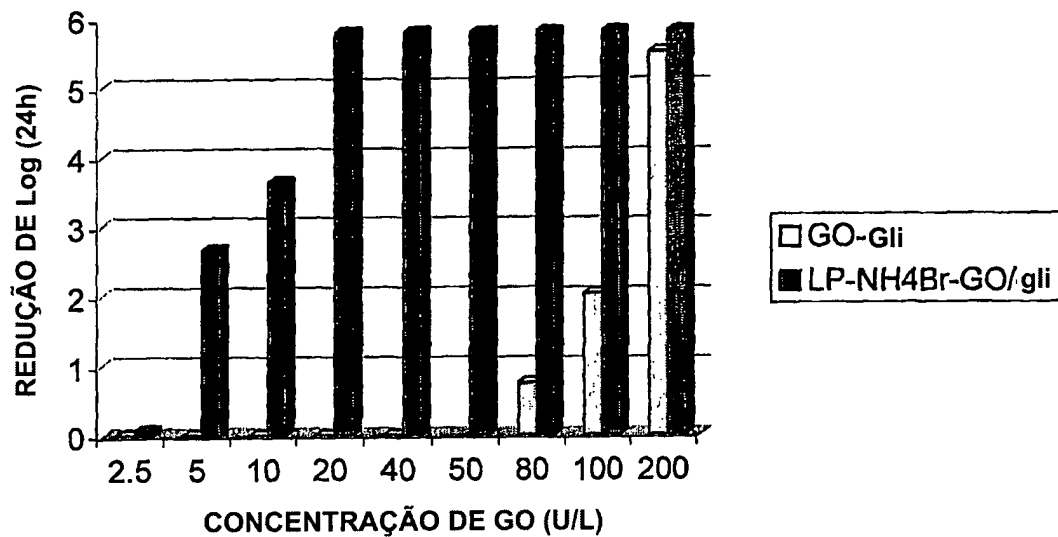


FIG.11

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE LP-NH₄Br-GO/gli
E GO/gli APENAS vs TEMPO DE CONTATO

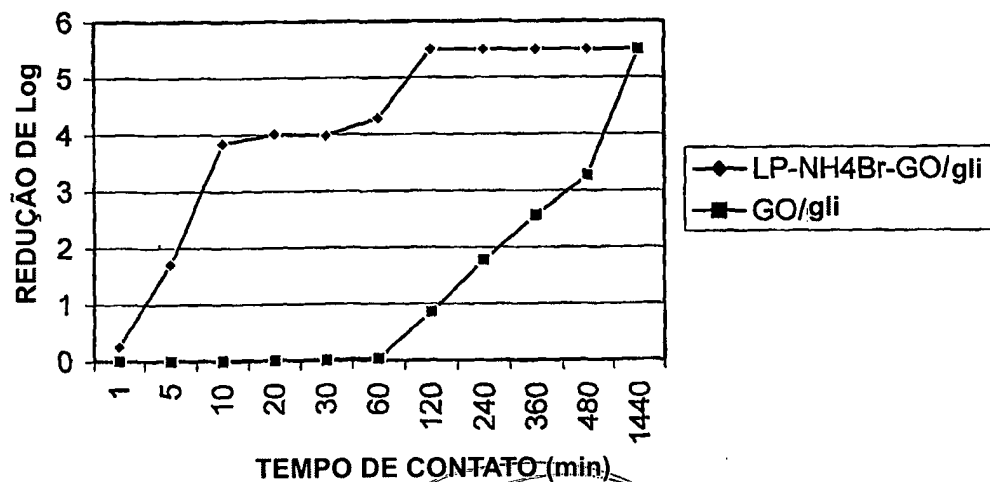


FIG.12

RESUMO

"MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, MÉTODO PARA MATAR OU INIBIR O CRESCIMENTO DE
5 MICROORGANISMOS EM UM SISTEMA AQUOSO OU EM UM SUBSTRATO, COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO".

Um método e composição para matar, prevenir, ou inibir o crescimento de microorganismos em um sistema aquoso ou em
10 um substrato capaz de suportar um crescimento de microorganismos são providos através da provisão de uma lactoperoxidase, peróxido de hidrogênio ou uma fonte de peróxido, um haleto, outro que não cloreto, ou um tiocianato e, opcionalmente, uma fonte de amônio, sob
15 condições nas quais a lactoperoxidase, o peróxido obtido de peróxido de hidrogênio ou de uma fonte de peróxido, haleto ou tiocianato e amônio obtido de uma fonte de amônio interagem para prover um agente antimicrobiano para o sistema aquoso ou para o substrato.