



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

(21) PI0706677-5 A2



(22) Data de Depósito: 22/01/2007  
(43) Data da Publicação: 05/04/2011  
(RPI 2100)

(51) Int.CI.:  
A61K 33/40  
A61P 29/00

(54) Título: MÉTODOS DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE SINUSITE COM SOLUÇÃO AQUOSA COM POTENCIAL DE OXIRREDUÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 20/01/2006 US 60/760,557, 20/01/2006 US 60/760,567, 20/01/2006 US 60/760,635, 20/01/2006 US 60/760,645

(73) Titular(es): Oculus Innovative Sciences, INC

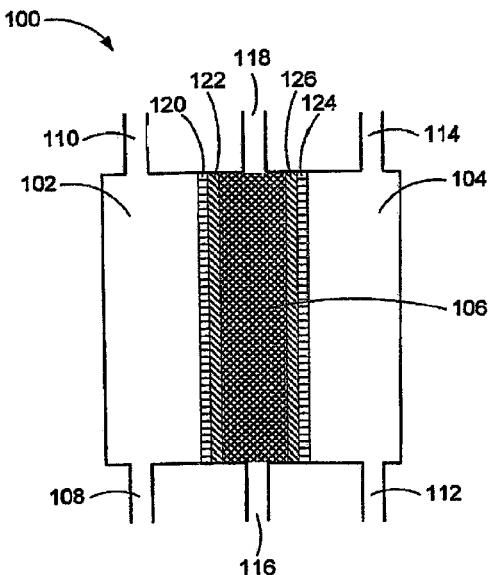
(72) Inventor(es): Andrés Gutiérrez, Hojabr Alimi

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2007060856 de 22/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/085019de 26/07/2007

(57) Resumo: MÉTODOS DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE SINUSITE COM SOLUÇÃO AQUOSA COM POTENCIAL DE OXIRREDUÇÃO. É fornecido um método para prevenção ou tratamento de sinusite por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma solução aquosa com potencial de oxirredução (ORP) que é estável por pelo menos cerca de vinte e quatro horas. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ser combinada com um ou mais veículos adequados. A solução aquosa com ORP pode ser administrada isoladamente ou, por exemplo, em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.



MÉTODOS DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE SINUSITE COM SOLUÇÃO  
AQUOSA COM POTENCIAL DE OXIRREDUÇÃO

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

Esse pedido de patente reivindica o benefício dos  
5 Pedidos Provisórios de Patente U.S. N°s 60/760.635,  
depositado em 20 de janeiro de 2006; 60/760.567, depositado  
em 20 de janeiro de 2006; 60/760,645, depositado em 20 de  
janeiro de 2006; e 60/760,557, depositado em 20 de janeiro  
de 2006; todos aqui incorporados por referência em suas  
10 totalidades.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os seios cranianos são câmaras de ar dentro dos ossos  
da face, sobrancelhas e mandíbula. Essas câmaras incluem os  
seios frontais na área da sobrancelha, os seios maxilares  
15 dentro de cada face, os seios etmoidais, logo atrás da  
ponte do nariz e entre os olhos, e os seios esfenoidais,  
localizados atrás do etmóide na região superior do nariz e  
atrás dos olhos. Os seios são revestidos por um epitélio do  
tipo respiratório com uma camada subepitelial subjacente  
20 rica em glândulas de muco pequenos vasos sanguíneos.

A sinusite é uma condição em que o revestimento dos  
seios torna-se inflamado. A sinusite pode ser aguda ou  
crônica. Os vírus são uma causa freqüente de sinusite  
aguda, que produz inflamação significativa. Essa inflamação  
25 resulta em produção aumentada de muco e congestão das  
passagens nasais. Quando há edema das membranas mucosas dos  
seios, o e muco são aprisionados por trás das aberturas  
estreitadas dos seios. Essa congestão predispõe o indivíduo  
a sinusite bacteriana. A inflamação crônica das passagens  
30 nasais, como rinite alérgica (febre do feno) também

predispõe o indivíduo a episódios de sinusite aguda. Rinite vasomotora, que pode ser causada, por exemplo, por umidade, ar frio, álcool, perfumes, e outras condições ambientais, também pode predispor o indivíduo à infecção dos seios da face.

A maioria das pessoas saudáveis carrega bactérias, como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, em seus tecidos do trato respiratório superior. O muco aprisionado por trás das aberturas estreitadas dos seios permite que as bactérias residentes se multipliquem e invadam o revestimento dos seios, gerando uma infecção bacteriana aguda. Da mesma forma, infecções fúngicas podem causar sinusite aguda. Embora fungos sejam abundantes no ambiente, eles normalmente são inofensivos às pessoas saudáveis. No entanto, fungos, como *Aspergillus*, podem causar doenças sérias em pessoas cujos sistemas imunológicos são hipersensíveis a *Aspergillus*.

A etiologia da sinusite crônica freqüentemente não é clara. A sinusite crônica é uma doença inflamatória que freqüentemente ocorre em pacientes com asma. Ela pode ser causada por agentes infecciosos, embora alérgenos transportados pelo ar, como poeira, mofo, e pólen, que ativam a rinite alérgica, possam contribuir ou causar a sinusite crônica. Uma resposta imune a antígenos em fungos também pode ser responsável por pelo menos alguns casos de sinusite crônica.

A sinusite é tratada tipicamente com fármacos que incluem descongestionantes, anti-histaminas, agentes antiinflamatórios não esteróides, esteróides, antibióticos, e antivirais. Cada um desses fármacos tem efeitos

colaterais e outras desvantagens. Por exemplo, agentes antiinflamatórios não esteróides podem produzir efeitos colaterais adversos gastrointestinais e cardiovasculares. Além disso, o uso de agentes antiinfecciosos como 5 antibióticos pode produzir reações alérgicas e também pode criar um ambiente que pode gerar o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos. Esteróides têm efeitos colaterais sistêmicos, devem ser retirados lentamente para evitar efeitos-rebote e, por causa de seus efeitos 10 imunossupressores, deve ser usados cuidadosamente para evitar que surja infecção como um resultado de imunossupressão. Quando a terapia com fármaco não é bem sucedida, a cirurgia é a única alternativa para tratar sinusite mas, a cirurgia pode resultar em morbidade 15 significativa, dor, e pode prolongar a recuperação. Conseqüentemente, há uma necessidade por métodos novos, seguros e eficazes para o tratamento ou a prevenção de sinusite.

A presente invenção fornece tais métodos. Essas e 20 outras vantagens da invenção, além de características adicionais da invenção, ficarão evidentes a partir da descrição da invenção aqui apresentada.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um método de tratamento ou 25 prevenção de sinusite em um paciente, cujo método inclui a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma solução aquosa com potencial de oxirredução (ORP), em que a solução é estável por pelo menos cerca de vinte e quatro horas. A solução aquosa com 30 ORP administrada de acordo com a presente invenção é

estável por pelo menos cerca de vinte e quatro horas e, preferivelmente, é estável por pelo menos cerca de dois meses, mais preferivelmente, é estável por pelo menos cerca de seis meses e, principalmente, é estável por pelo menos 5 cerca de um ano (por exemplo, um ano ou mais).

De acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada à via aérea respiratória superior (por exemplo, o trato respiratório superior) e/ou um ou mais seios cranianos no paciente, por exemplo, de 10 modo a fazer contato com um ou mais tecidos na via aérea respiratória superior e/ou seios cranianos com a solução aquosa com ORP. Os seios cranianos podem incluir, por exemplo, os seios frontais, seios maxilares, seios etmoidais, e seios esfenoidais. Em uma modalidade, a 15 solução aquosa com ORP é administrada a um ou mais dos seios etmoidais do paciente, por exemplo, de modo a fazer contato com um ou mais tecidos dos seios etmoidais com a solução aquosa com ORP.

De acordo com a presente invenção, a solução aquosa 20 com ORP pode ser administrada por qualquer via adequada incluindo, por exemplo, via intranasal, através da boca ou ambos. Além disso, a solução aquosa com ORP pode ser administrada em qualquer forma adequada como, por exemplo, um líquido, spray, névoa ou aerossol, e pode ser liberada 25 por qualquer método adequado, por exemplo, aerossolização, nebulização e atomização. Em uma modalidade, a solução aquosa com ORP é administrada na forma de gotículas que possuem um diâmetro na faixa de cerca de 0,1 micrôn a cerca de 100 micrões, preferivelmente 1 micrôn a cerca de 10 30 micrões.

O método da presente invenção pode ser eficaz para o tratamento ou a prevenção de sinusite aguda e sinusite crônica, e pode ser eficaz para o tratamento ou a prevenção de sinusite que resulta, por exemplo, de uma reação alérgica, asma, ou inflamação que afeta um ou mais tecidos em um ou mais dos seios cranianos ou na via aérea respiratória superior. O método da presente invenção também pode ser eficaz para o tratamento ou a prevenção de sinusite que resulta de uma infecção, por exemplo, por um ou mais microorganismos, que podem incluir vírus, bactérias e fungos, que são preferivelmente susceptíveis à solução aquosa com ORP. Vírus suscetíveis podem incluir, por exemplo, vírus coxsackie, adenovírus, rinovírus e vírus influenza. Bactérias suscetíveis podem incluir, por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, estafilococos, estreptococos não pneumocócicos, corinebactéria e anaeróbios. Fungos suscetíveis podem incluir, por exemplo, zigomicetos, aspergilo e cândida.

De acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada isoladamente ou em combinação (por exemplo, diluída) com um ou mais veículos adequados. Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser combinada com até cerca de 25% (p/p ou vol/vol) de um ou mais veículos adequados; até cerca de 50% (p/p ou vol/vol) de um ou mais veículos adequados, até cerca de 75% (p/p ou vol/vol) de um ou mais veículos adequados, até cerca de 90% (p/p ou vol/vol) de um ou mais veículos adequados, ou até cerca de 95% (p/p ou vol/vol) ou mais de um ou mais veículos adequados. Veículos adequados podem incluir, por exemplo, água (por exemplo, água destilada, água estéril,

por exemplo, água estéril para injeção, soro fisiológico estéril, e semelhantes). Veículos adequados também pode incluir um ou mais veículos descritos em Pedido de Patente U.S. Nº 10/916.278 (aqui incorporado por referência).

5 De acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada isoladamente ou em combinação com (ou em conjunto com) pelo menos um agente terapêutico adicional (ou seja, um ou mais agentes terapêuticos com exceção da solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção). Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser administrada em combinação com ou em conjunto com um ou mais agentes terapêuticos selecionados do grupo que consiste em anti-histamínicos, descongestionantes, agentes antiinfecciosos (por exemplo, agentes antibióticos, agentes antivirais, ou antifúngicos), agentes antiinflamatórios, e combinações destes.

10

15

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 ilustra uma célula de eletrólise de três câmaras para a produção de uma solução aquosa com ORP exemplar.

A FIG. 2 ilustra uma célula de eletrólise de três câmaras e descreve espécies iônicas que supostamente são geradas durante o processo de produção.

A FIG. 3 é um diagrama de fluxo esquemático de um processo para a produção de uma solução aquosa com ORP exemplar.

A FIGS. 4A-4C mostram uma comparação gráfica da viabilidade celular, apoptose e necrose em fibroblastos diplóides humanos (HDFs) tratados com uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN) versus peróxido de hidrogênio (HP).

A FIG. 5 é uma comparação gráfica dos níveis de adutos de 8-hidróxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) em HDFs tratados com uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN) versus 500 µM de peróxido de hidrogênio (HP).

5 A FIG. 6 ilustra o envelhecimento celular demonstrado por (3-galactosidase expressão em HDFs após exposição crônica a concentrações baixas de uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN) versus peróxido de hidrogênio (HP).

10 A FIG. 7 ilustra o efeito sobre a degranulação de mastócitos ativados por antígeno tratados com várias concentrações de uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN).

A FIG. 8 ilustra comparativamente o efeito sobre a degranulação de mastócitos ativados por antígeno tratados com cromoglicato.

15 A FIG. 9 ilustra o efeito sobre a degranulação de mastócitos ativados por antígeno e ativados por ionóforo de cálcio (A23187) tratados com várias concentrações de uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN).

As FIGS. 10A-10B são ensaios de proteção de RNase que 20 ilustram níveis de mRNA de citocina após ataque com antígeno em mastócitos de controle versus mastócitos tratados com solução aquosa com ORP.

A FIG. 11 é uma comparação gráfica da secreção de TNF-α por mastócitos ativados por antígeno tratados com várias 25 concentrações de uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN).

A FIG. 12 é uma comparação gráfica da secreção de MIP1-a por mastócitos ativados por antígeno tratados com várias concentrações de uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN).

30 A FIG. 13 é uma comparação gráfica da secreção de IL-6

por mastócitos ativados por antígeno tratados com várias concentrações de uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN).

A FIG. 14 é uma comparação gráfica da secreção de IL-13 por mastócitos ativados por antígeno tratados com várias 5 concentrações de uma solução aquosa com ORP exemplar (MCN).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um método de prevenção ou tratamento de sinusite (por exemplo, rinossinusite, sinusite aguda, sinusite crônica, e semelhantes) em um 10 paciente, cujo método compreende a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma solução aquosa com potencial de oxirredução (ORP) (também conhecida como água superoxidata (SOW)), em que a solução é estável por pelo menos cerca de vinte e quatro horas. De 15 acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada à via aérea respiratória superior (por exemplo, o trato respiratório superior) e/ou um ou mais seios cranianos no paciente, por exemplo, de modo a fazer contato com um ou mais tecidos na via aérea 20 respiratória superior ou seios cranianos com a solução aquosa com ORP. Os seios cranianos podem incluir, por exemplo, os seios frontais, seios maxilares, seios etmoidais, e seios esfenoidais. Em uma modalidade, a solução aquosa com ORP é administrada a um ou mais do 25 paciente's seios etmoidais, por exemplo, de modo a fazer contato com um ou mais tecidos que residem nos seios etmoidais com a solução aquosa com ORP.

De acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada em uma quantidade eficaz para 30 o tratamento ou a prevenção de (por exemplo, inibição do

surgimento de, inibição do agravamento de, diminuição da probabilidade de) sinusite, incluindo sinusite aguda e sinusite crônica. A sinusite tratável ou evitável de acordo com a presente invenção pode incluir sinusite que resulta, 5 por exemplo, de contato com um estímulo nocivo, lesão, infecção, inflamação, reação autoimune, hipersensibilidade, asma, e reação alérgica, incluindo reações alérgicas associadas à liberação de histamina celular.

Sinusite crônica tipicamente refere-se à inflamação 10 dos seios que continua por pelo menos 3 semanas, mas a inflamação pode(e freqüentemente) continua por meses ou mesmo anos. Alergias estão freqüentemente associadas à sinusite crônica. Além disso, pacientes com asma têm uma freqüência particularmente elevada de sinusite crônica. A 15 inalação de alérgenos transportados pelo ar (substâncias que provocam uma reação alérgica) como, por exemplo, poeira, mofo e pólen, freqüentemente desencadeiam reações alérgicas (por exemplo, rinite alérgica) as quais, por sua vez, podem contribuir para a sinusite (particularmente 20 rinossinusite ou rinite). As pessoas alérgicas a fungos podem desenvolver uma condição denominada "sinusite alérgica fúngica". O clima úmido ou os poluentes do ar e em edificações também podem afetar pessoas sujeitas à sinusite crônica.

25 Da mesma forma que a sinusite aguda, a sinusite crônica é mais comum em pacientes com deficiência imunológica ou anormalidades da secreção ou movimentação de muco (por exemplo, deficiência imunológica, infecção por HIV, fibrose cística, síndrome de Kartagener). Além disso, 30 alguns pacientes possuem asma grave, pólipos nasais, e

respostas asmáticas graves à aspirina e medicações semelhantes à aspirina (denominados fármacos antiinflamatórios não esteróides, ou NSAIDs). Esses últimos pacientes possuem uma freqüência elevada de sinusite 5 crônica.

Um médico pode diagnosticar sinusite pela história médica, pelo exame físico, por raios X e, se necessário, por exames de ressonância nuclear magnética ou de tomografia computadorizada. Após o diagnóstico de sinusite 10 e da identificação de uma possível causa, o médico pode prescrever um esquema de tratamento que irá reduzir a inflamação e aliviar os sintomas. O tratamento de sinusite aguda tipicamente exige o re-estabelecimento da drenagem das passagens nasais, o controle ou a eliminação da fonte 15 da inflamação e o alívio da dor. Os médicos geralmente recomendam descongestionantes para reduzir a congestão, antibióticos para controlar uma infecção bacteriana, se presente, e analgésicos para reduzir a dor. Quando tratamento com fármacos não é bem sucedido, a cirurgia pode 20 ser a única alternativa para o tratamento de sinusite crônica, por exemplo, remoção de adenóides, remoção de pólipos nasais, reparo de um desvio de septo, cirurgia sinusal endoscópica, e semelhantes. Acredita-se que a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a 25 presente invenção pode ser usada para o tratamento de sinusite crônica como uma alternativa para evitar potencialmente as terapias mais agressivas como, por exemplo, antibióticos e cirurgia.

Surpreendentemente, verificou-se que a solução aquosa 30 com ORP administrada de acordo com a invenção é um inibidor

altamente eficaz da degranulação de mastócitos, uma das cascatas biológicas causadoras de inflamação primária. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção inibe a degranulação de mastócitos,  
5 independentemente do fato deles serem ativados com um antígeno ou um ionóforo de cálcio. Também surpreendentemente, verificou-se que a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção inibe não seletivamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias  
10 em mastócitos. Por exemplo, a solução aquosa com ORP da presente invenção pode inibir a secreção de, por exemplo, TNF- $\alpha$  e MIP1- $\alpha$  em mastócitos. Acredita-se que a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias em  
15 outras células que secretam citocina. Esses achados demonstram que a água ORP administrada de acordo com a presente invenção deve exibir eficácia antiinflamatória ampla.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção preferivelmente inibe a degranulação de mastócitos em mais de cerca de 50% em relação aos mastócitos não tratados, mais preferivelmente em mais de cerca de 80% em relação aos mastócitos não tratados com, ainda mais preferivelmente, em mais de cerca de 90% em relação aos  
25 mastócitos não tratados com, e ainda mais preferivelmente, em mais de cerca de 95% em relação aos mastócitos não tratados com, quando colocados em contato com a solução aquosa com ORP por até cerca de 30 minutos, mais preferivelmente, por até cerca de 15 minutos e, ainda mais preferivelmente, por até cerca de 5 minutos. De acordo com  
30

o método da invenção, a secreção de histamina (por exemplo, de degranulação) pode ser terapeuticamente inibida pela administração da solução aquosa com ORP isoladamente ou em combinação com um diluente (por exemplo, água ou soro fisiológico). Por exemplo, secreção de histamina pode ser terapeuticamente inibida por administração de composições nas quais a solução aquosa com ORP é diluída, por exemplo, por uma proporção de até cerca de 50% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente, por uma proporção de até cerca de 10% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente, por uma proporção de até cerca de 5% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente, ou mesmo por uma proporção de até cerca de 1% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também inibe preferivelmente a secreção de TNF- $\alpha$  em mais de cerca de 50%, mais preferivelmente em mais de cerca de 60%, ainda mais preferivelmente, em mais de cerca de 70%, e ainda mais preferivelmente, em mais de cerca de 85%. Além disso, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também inibe preferivelmente a secreção de MIDI-a em mais de 25%, mais preferivelmente em mais de cerca de 50% e, ainda mais preferivelmente, em mais de cerca de 60%. Além disso, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também inibe preferivelmente a secreção de IL-6 e/ou IL-13 em mais de 25%, mais preferivelmente em mais de cerca de 50% e, ainda mais preferivelmente, em mais de cerca de 60%. De acordo com o método da invenção, a secreção de citocina pode ser

inibida terapeuticamente pela administração da solução aquosa com ORP isoladamente ou em combinação com um diluente (por exemplo, água ou soro fisiológico). Por exemplo, a secreção de citocina pode ser inibida 5 terapeuticamente por administração de composições nas quais a solução aquosa com ORP é diluída, por exemplo, até cerca de 50% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente, até cerca de 25% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente, até cerca de 10% (vol/vol) de solução aquosa com 10 ORP/diluente, até cerca de 5% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente, ou até mesmo cerca de 1% (vol/vol) de solução aquosa com ORP/diluente.

A sinusite tratável ou evitável de acordo com a presente invenção também pode incluir sinusite que resulta 15 de uma infecção. Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de sinusite, em que a sinusite resulta de infecção causada por, por exemplo, um ou mais microorganismos selecionados do grupo que consiste em vírus, bactérias e fungos. 20 Conseqüentemente, a presente invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de a viral sinusite, em que a sinusite está associada com infecção por um ou mais vírus, que são preferivelmente suscetíveis à solução aquosa com ORP administrada ao paciente. vírus suscetíveis podem 25 incluir, por exemplo, um ou mais vírus selecionados do grupo que consiste em HIV, vírus coxsackie, adenovírus, rinovírus, herpes vírus, vírus influenza, e combinações destes.

A presente invenção também fornece um método de 30 tratamento ou prevenção de uma sinusite bacteriana, em que

a sinusite está associada com infecção por um ou mais bactérias, que são preferivelmente suscetíveis à solução aquosa com ORP administrada ao paciente. Bactérias suscetíveis pode incluir, por exemplo, uma ou mais 5 bactérias selecionadas do grupo que consiste em estafilococos, estreptococos, corinebactéria, anaeróbios, e, particularmente, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. A presente invenção ainda fornece um método de tratamento ou prevenção de uma sinusite fúngica, em que a 10 sinusite está associada com infecção por um ou mais fungos, que são preferivelmente suscetíveis à solução aquosa com ORP administrada ao paciente. Fungos suscetíveis podem incluir, por exemplo, um ou mais fungos selecionados do grupo que consiste em zigomicetos, aspergilo e cândida.

15 A invenção também fornece métodos para a morte de bactérias em biofilmes, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* em biofilmes. A invenção ainda fornece métodos para a morte de *Moraxella catarrhalis* e bactérias resistentes a antibióticos, por exemplo, *Streptococcus* resistente a 20 penicilina. Os métodos aqui revelados podem ser usados de acordo com a invenção para a morte de bactérias com o uso de soluções de água com ORP mais rápido do que com a utilização de bacitracina.

A presente invenção também pode incluir a 25 administração com a solução aquosa com ORP (por exemplo, por co-administração da solução aquosa com ORP, por administração da solução aquosa com ORP em conjunto com, ou por combinação de uma solução aquosa com ORP) com uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um agente 30 terapêutico adicional (ou seja, um ou mais agentes

terapêuticos com exceção da solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção). O agente terapêutico adicional pode incluir, por exemplo, um ou mais fármacos selecionados do grupo que consiste em anti-histaminas, descongestionantes, agentes antiinfecciosos (por exemplo, agentes antibacterianos (por exemplo, antibióticos), agentes antivirais, e antifúngicos agentes), agentes antiinflamatórios, e combinações destes

Anti-histamínicos adequados podem incluir, por exemplo, difenidramina, clorfeniramina, bromfeniramina, loratadina, clemastina, fexofenadina, derivados desses, e combinações destes. Descongestionantes adequados podem incluir, por exemplo, fenilefrina, pseudoefedrina, outros agonistas α- e β-adrenérgicos, derivados desses, e combinações destes. Agentes antibacterianos adequados podem incluir, por exemplo, penicilinas, cefalosporinas ou outras β-lactamas, macrolídeos (por exemplo, eritromicina, 6-O-metileritromicina, e azitromicina), fluorquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglicosídeos, clindamicina, quinolonas, metronidazol, vancomicina, cloranfenicol, derivados eficazes antibacterianos desses, e combinações destes. Agentes antifúngicos adequados podem incluir, por exemplo, anfotericina B, fluconazol, flucitosina, cetoconazol, miconazol, derivados desses, e combinações destes. Agentes antivirais adequados podem incluir, por exemplo, aciclovir, amantadina, didanosina, famciclovir, fortovase, ganciclovir, valaciclovir, zanamivir, interferons, derivados desses, e combinações destes. Agentes antiinflamatórios adequados podem incluir, por exemplo, um ou mais fármacos antiinflamatórios, por

exemplo, um ou mais esteróides antiinflamatórios ou um ou mais fármacos antiinflamatórios não esteróides (NSAIDs). Exemplos de fármacos antiinflamatórios podem incluir, por exemplo, antagonistas de receptor de leucotrieno,  
5 ciclofilinas, proteínas de ligação FK, esteróides e NSAIDs.

De acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada topicalmente, por exemplo, como um líquido, spray, névoa, aerossol ou vapor por qualquer processo adequado, por exemplo, por pulverização,  
10 aerossolização, nebulização, atomização, e semelhantes. Em uma modalidade, a solução aquosa com ORP é administrada à via aérea respiratória superior e/ou um ou mais seios cranianos como um spray, névoa, ou aerossol. Quando a solução aquosa com ORP é administrada por aerossolização,  
15 nebulização ou atomização. Em uma modalidade, o método da presente invenção inclui a administração da solução aquosa com ORP na forma de gotículas que possuem um diâmetro na faixa de cerca de 1 mícron a cerca de 10 mícrons de modo a fazer contato com um ou mais tecidos mucosos na via aérea  
20 respiratória superior ou um ou mais seios cranianos com a solução aquosa com ORP.

De acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada pela liberação da solução aquosa com ORP isoladamente, ou por combinação (por exemplo, mistura) da solução aquosa com ORP com um ou mais veículos adequados (por exemplo, um diluente). Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser misturada com um ou mais veículos adequados na câmara de um dispositivo (por exemplo, um nebulizador ou um dispositivo que pode  
30 distribuir a mistura como um spray), e a mistura resultante

pode ser liberada da câmara do dispositivo, por exemplo, diretamente à via aérea respiratória superior e/ou um ou mais seios cranianos (por exemplo, por via intranasal, através da boca, ou ambos). Alternativamente, a solução aquosa com ORP pode ser misturada com um ou mais veículos adequados (por exemplo, um diluente) com o uso um dispositivo de múltiplas câmaras, por exemplo, um dispositivo de câmara dupla, em que a solução aquosa com ORP e veículo(s) residem em câmaras separadas e são combinados e/ou misturados quando eles saem das câmaras de modo que a solução aquosa com ORP e veículo(s) são combinados com a (por exemplo, imediatamente antes ou simultaneamente) liberação ao paciente.

Métodos e dispositivos úteis para aerossolização, nebulização e atomização, são bem conhecidos na técnica. Nebulizadores médicos, por exemplo, têm sido usados para liberar uma dose metrificada de um líquido fisiologicamente ativo em um jato de gás inspiratório para inalação por um receptor. Veja, por exemplo, Patente U.S. N° 6,598,602 (aqui incorporadas por referência). Os nebulizadores médicos podem operar para a geração de gotículas líquidas, que formam um aerossol com o gás inspiratório. Em outras circunstâncias, os nebulizadores médicos podem ser usados para injetar gotículas de água em um jato de gás inspiratório para o fornecimento de gás com um teor de umidade adequado a um receptor, o que é particularmente útil quando o jato de gás inspiratório for fornecido por um auxílio mecânico de respiração como, por exemplo, um respirador, um ventilador ou sistema de liberação de anestésicos.

Um nebulizador exemplar é descrito, por exemplo, em WO 95/01137, que descreve um dispositivo manual que opera para ejetar gotículas de um líquido médico em um jato de ar em movimento (jato de gás inspiratório), que é gerado por inalação de um receptor através de um bocal. Outro exemplo pode ser encontrado na Patente U.S. Nº 5.388.571 (aqui incorporada por referência), que descreve um sistema ventilatório de pressão positiva que fornece controle e aumento da respiração para um paciente com insuficiência respiratória e que inclui um nebulizador para a liberação de partículas de medicação líquida nas vias aéreas e nos alvéolos dos pulmões de um paciente. A Patente U.S. Nº 5.312.281 (aqui incorporada por referência) descreve um nebulizador de onda ultra-sônica, que atomiza água ou líquido em baixa temperatura e supostamente pode ajustar o tamanho da névoa. Além disso, Patente U.S. Nº 5,287,847 (aqui incorporadas por referência) descreve a aparelho pneumático de nebulização com taxas de fluxo e volumes de saída escalonáveis para a liberação de um aerossol medicinal a neonatos, crianças e adultos. Além disso, a Patente U.S. Nº 5.063.922 (aqui incorporada por referência) descreve um atomizador ultra-sônico. A solução aquosa com ORP também pode ser dispensada em forma de aerossol como parte de um sistema de inalação para o tratamento de infecções nos pulmões e/ou nas passagens aéreas ou para a cicatrização de feridas nestas partes do corpo.

Para aplicações em maior escala, pode ser usado um dispositivo adequado para dispersar uma solução aquosa com ORP no ar, incluindo, sem limitação, umidificadores, nebulizadores, pulverizadores, vaporizadores, atomizadores,

sprays de água e outros dispositivos de spray. Estes dispositivos permitem a dispersão da solução aquosa com ORP de forma contínua. Pode ser empregado um ejetor que mistura diretamente a água em um bocal. Uma solução aquosa com ORP pode ser convertida em vapor, por exemplo, vapor de baixa pressão, e liberada no jato de ar. Vários tipos de umidificadores podem ser usados como, por exemplo, umidificadores ultra-sônicos, umidificadores ou vaporizadores de jato e umidificadores evaporativos. O dispositivo específico usado para dispersar uma solução aquosa com ORP pode ser incorporado em um sistema de ventilação para fornecer a aplicação disseminada da solução aquosa com ORP por toda a casa ou instalação de atendimento médico (por exemplo, hospital, casa de repouso etc). A solução aquosa com ORP também pode ser administrada a um paciente em uma câmara ou tenda, ou pode ser administrada através de uma máscara ou por via endoscópica.

De acordo com a invenção, como aqui indicado, uma solução aquosa com ORP pode ser administrada isoladamente ou em combinação com um ou mais veículo farmaceuticamente aceitáveis, que podem incluir, por exemplo, veículos, adjuvantes, excipientes, diluentes, combinações destes, e semelhantes. Tais veículos são preferivelmente compatíveis com uma ou mais das espécies químicas que existem na solução aquosa com ORP. Aqueles habilitados na técnica podem determinar facilmente a formulação e o método apropriados para a administração da solução aquosa com ORP usada de acordo com a presente invenção. Quaisquer ajustes necessários na dose podem ser feitos rapidamente por aqueles habilitados na técnica para atender à natureza e/ou

gravidade da condição tratada, à luz de um ou mais fatores clinicamente relevantes como, por exemplo, efeitos colaterais, alterações na condição geral do paciente, e semelhantes.

5 Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser formulada por combinação ou diluição da solução aquosa com ORP com até cerca de 25% (p/p ou vol/vol) de um veículo adequado, até cerca de 50% (p/p ou vol/vol) de um veículo adequado, até cerca de 75% (p/p ou vol/vol) de um veículo adequado, até cerca de 90% (p/p ou vol/vol) de um veículo adequado, até cerca de 95% (p/p ou vol/vol) de um veículo adequado, ou até mesmo cerca de 99% (p/p ou vol/vol) ou mais de um veículo adequado. Veículos adequados podem incluir, por exemplo, água (por exemplo, água destilada, 10 água estéril, por exemplo, água estéril para injeção, soro fisiológico estéril, e semelhantes). Veículos adequados também pode incluir um ou mais veículos descritos em Pedido de Patente U.S. Nº 10/916.278 (aqui incorporado por referência). Exemplos de formulações podem incluir soluções 15 nas quais a solução aquosa com ORP é diluída com água estéril, soro fisiológico estéril, ou uma combinação destes. Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser diluída por até cerca de 25% (vol/vol), por até cerca de 20 50% (vol/vol), por até cerca de 75% (vol/vol), por até cerca de 90% (vol/vol), por até cerca de 95% (vol/vol), ou por até 99% (vol/vol) ou mais com água estéril, soro fisiológico estéril, ou uma combinação destes. 25

Verificou-se que a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é praticamente livre de toxicidade 30 para tecidos normais e células mamíferas normais. A solução

aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção não causa diminuição significativa na viabilidade de células eucarióticas, não causa aumento significativo da apoptose, não causa aceleração significativa do envelhecimento celular e/ou não causa dano oxidativo significativo do DNA em células mamíferas. A não toxicidade é particularmente vantajosa e talvez até mesmo surpreendente, considerando que o poder desinfetante da solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é aproximadamente equivalente àquele do peróxido de hidrogênio, embora, diferente de peróxido de hidrogênio, seja praticamente não tóxica para tecidos normais e células mamíferas normais. Esses achados demonstram que a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção é segura para uso, por exemplo, em mamíferos, incluindo seres humanos.

Para a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção, a taxa de viabilidade celular é de, preferivelmente, pelo menos cerca de 65%, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 70% e, ainda mais preferivelmente, pelo menos cerca de 75% após de cerca de 5 a cerca de 30 minuto exposição à solução aquosa com ORP. Adicionalmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção preferivelmente faz com que até cerca de 10% de células, mais preferivelmente, apenas até cerca de 5% de células e, ainda mais preferivelmente, apenas até cerca de 3% de células sejam expostas à AnexinaV em suas superfícies celulares, quando colocadas em contato com a solução aquosa com ORP por até cerca de trinta minutos ou menos (por exemplo, após cerca de trinta minutos ou apó-

cerca de cinco minutos de contato com a solução aquosa com ORP).

Além disso, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção preferivelmente faz com que menos de 5 cerca de 15% de células, mais preferivelmente, menos de cerca de 10% de células e, ainda mais preferivelmente, menos de cerca de 5% de células expressem a enzima SA- $\beta$ -galactosidase após exposição crônica à solução aquosa com ORP. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a 10 invenção preferivelmente faz com que a fração da formação de aduto oxidativo de DNA causada por peróxido de hidrogênio em células tratadas sob condições equivalentes, por exemplo, menos de cerca de 20% da formação de aduto oxidativo de DNA, menos de cerca de 10% da formação de 15 aduto oxidativo de DNA, ou cerca de 5% ou menos da formação de aduto oxidativo de DNA normalmente causada por peróxido de hidrogênio em células tratadas sob condições equivalentes.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a 20 invenção não produz degradação de RNA significativa. Conseqüentemente, o RNA extraído de culturas de células humanas após cerca de 30 minutos de exposição à solução aquosa com ORP ou após cerca de 3 horas de exposição, e analisado por eletroforese em gel desnaturante, tipicamente 25 não exibirá degradação de RNA significativa e apresentará tipicamente duas bandas distintas que correspondem aos RNAs ribossômicos eucarióticos (ou seja, 28S e 18S), indicando que a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção deixa o RNA substancialmente intacto. Da mesma forma, o RNA extraído de culturas de células humanas após 30

cerca de 30 minutos de exposição à solução aquosa com ORP ou após cerca de 3 horas de exposição, pode ser submetida à transcrição reversa e amplificação (RT- PCR) do gene constitutivo da GAPDH humana (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e resulta em uma forte banda de GAPDH na eletroforese em gel dos produtos de RT-PCR. Ao contrário, células tratadas com HP por um período similar mostram degradação de RNA significativa e pouco, ou nenhum, produto GAPDH por RT-PCR.

10 Geralmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção pode ser administrada por várias diferentes vias, por exemplo, parenteralmente, por via endoscópica ou diretamente à superfície de a tecido biológico, por exemplo, à pele e/ou a uma ou mais  
15 superfícies mucosas. A administração parenteral pode incluir, por exemplo, a utilização da administração da solução aquosa com ORP por via intramuscular, subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intratecal, intravesical ou em um espaço sinovial. A administração endoscópica da solução  
20 aquosa com ORP pode incluir, por exemplo, o uso de nasoscopia, broncoscopia, colonoscopia, sigmoidoscopia, histeroscopia, laparoscopia, artroscopia, gastroscopia ou uma abordagem transuretral. A administração da solução aquosa com ORP a uma superfície mucosa pode incluir, por  
25 exemplo, a administração a uma superfície mucosa do seio, nasal, oral, traqueal, brônquica, esofágica, gástrica, intestinal, peritoneal, uretral, vesicular, vaginal, vaginal, uterina, da trompa de Falópio e sinovial. A administração parenteral também pode incluir a  
30 administração da solução aquosa com ORP por via

intravenosa, subcutânea, intramuscular, ou intraperitoneal. Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser administrada por via intravenosa, por exemplo, como descrito nas Patentes U.S. Nos 5,334,383 e 5,622,848 (aqui incorporadas 5 por referência), que descrevem métodos de tratamento de miocardite viral, esclerose múltipla, e AIDS, por meio da administração intravenosa de soluções de água com ORP.

A quantidade terapeuticamente eficaz administrada ao paciente, por exemplo, um mamífero, particularmente um ser 10 humano, no contexto da presente invenção deve ser suficiente para produzir uma resposta terapêutica ou profilática no paciente ao longo de um intervalo de tempo razoável. A dose pode ser facilmente determinada com a utilização de métodos que são bem conhecidos na técnica. 15 Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que o nível de dosagem específico para qualquer paciente em particular dependerá de diversos fatores terapeuticamente relevantes em potencial. Por exemplo, a dose pode ser determinada com base na potência da solução aquosa com ORP em particular 20 empregada, na gravidade da condição, no peso corporal do paciente, na idade do paciente, na condição física e mental do paciente, saúde geral, sexo, dieta, e semelhantes. O tamanho da dose também pode ser determinado com base na existência, natureza, e extensão de quaisquer efeitos 25 colaterais adversos que possam acompanhar a administração da solução aquosa com ORP em particular. É desejável, sempre que possível, manter os efeitos colaterais adversos em um mínimo

Fatores que podem considerados para uma dosagem 30 específica podem incluir, por exemplo, biodisponibilidade,

perfil metabólico, tempo de administração, via de administração, taxa de excreção, a farmacodinâmica associada a uma solução aquosa com ORP em particular em um paciente em particular, e semelhantes. Outros fatores podem 5 incluir, por exemplo, a potência ou eficácia da solução aquosa com ORP com relação à condição específica a ser tratada, à gravidade dos sintomas apresentados antes ou durante o curso da terapia, e semelhantes. Em alguns casos, o que constitui uma quantidade terapeuticamente eficaz 10 também pode ser determinado, em parte, com a utilização de um ou mais dos ensaios, por exemplo, bioensaios, que são indicadores clinicamente razoáveis da eficácia de uma solução aquosa com ORP em particular para o tratamento ou a prevenção de uma condição em particular.

15 De acordo com a presente invenção, a solução aquosa com ORP pode ser administrada isoladamente ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais a um paciente, por exemplo, um ser humano, para tratar uma condição existente, incluindo sinusite. A solução aquosa 20 com ORP também pode ser administrada profilaticamente, isoladamente ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, a um paciente, por exemplo, um ser humano, que foi exposto a um ou mais agentes causadores associados à condição. Por exemplo, a solução aquosa com 25 ORP administrada de acordo com a invenção pode ser adequadamente administrada a um paciente que foi exposto a um ou mais microorganismos infecciosos (por exemplo, vírus, bactérias e/ou fungos) profilaticamente para inibir ou diminuir a probabilidade de sinusite (e/ou infecção) 30 associada com o microorganismo em um paciente, ou diminuir

a gravidade de a sinusite (e/ou infecção) que pode se desenvolver como um resultado de tal exposição.

Aqueles habilitados na técnica observarão que métodos adequados de administração da solução aquosa com ORP são disponíves e, embora possa ser usada mais de uma via de administração, é possível que uma via particular possa fornecer uma reação mais imediata e mais eficaz do que outra via. A quantidade terapeuticamente eficaz pode ser a dose necessária para se obter um "nível eficaz" da solução aquosa com ORP em um paciente individual. A quantidade terapeuticamente eficaz pode ser definida, por exemplo, como a quantidade necessária que deve ser administrada a um paciente individual para se obter um nível sangüíneo, nível tecidual (por exemplo, nível em um ou mais tecidos da via aérea respiratória superior e/ou seio(s) craniano(s) e/ou nível intracelular da solução aquosa com ORP (ou de uma ou mais espécies ativas nela contida) para evitar ou tratar a condição no paciente.

Quando o nível eficaz é usado como um limite final preferido para a dosagem, a dose e a posologia reais podem variar, dependendo, por exemplo, de diferenças entre indivíduos em termos de farmacocinética, distribuição, metabolismo, e semelhantes. O nível eficaz também pode variar quando a solução aquosa com ORP é usada em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, um ou mais agentes antiinfecciosos, um ou mais agentes de "moderação", "modulação" ou "agentes de neutralização", por exemplo, como descrito nas Patentes U.S. Nos 5.334.383 e 5.622.848 (aqui incorporadas por referência), um ou mais agentes antiinflamatórios, e

semelhantes.

Um indicador apropriado pode ser usado para determinar e/ou monitorar o nível eficaz. Por exemplo, o nível eficaz pode ser determinado por análise direta (por exemplo, 5 química analítica) ou por análise indireta (por exemplo, com indicadores clínicos bioquímicos) de amostras adequadas de pacientes (por exemplo, sangue e/ou tecidos). O nível eficaz também pode ser determinado, por exemplo, por observações diretas ou indiretas como, por exemplo, a 10 concentração de metabólitos urinários, mudanças em marcadores associados à condição (por exemplo, contagem viral no caso de uma infecção viral), análise da histopatologia e imunoquímica, diminuição dos sintomas associada com o condição, e semelhantes.

15 Soluções de água com ORP convencionais possuem um prazo de validade extremamente limitado, normalmente apenas poucas horas. Em consequência dessa vida útil curta, o uso de soluções de água com ORP convencionais exige que a produção ocorra próximo do ponto de uso. Do ponto de vista 20 da praticidade, isso significa que a instalação predial, por exemplo, um local de atendimento médico, por exemplo, um hospital, tem que adquirir, abrigar e manter o equipamento necessário para produzir tais soluções de água com ORP convencionais. Adicionalmente, as técnicas 25 convencionais de fabricação não foram capazes de produzir quantidades suficientes em escala comercial para permitir o uso disseminado, por exemplo, como um agente desinfetante geral para instalações para atendimento médico.

30 Diferentemente das soluções de água com ORP convencionais, a solução aquosa com ORP administrada de

acordo com a invenção é estável por pelo menos cerca de vinte e quatro após sua preparação. Além disso, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é geralmente segura para o ambiente e, dessa forma, evita a 5 necessidade de procedimentos de descarte dispendiosos. Preferivelmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é estável por pelo menos cerca de uma semana (por exemplo, uma semana, duas semanas, três semanas, quatro semanas etc.) e, mais preferivelmente, é 10 estável por pelo menos cerca de dois meses. Ainda mais preferivelmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é estável por pelo menos cerca de seis meses. Ainda mais preferivelmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é estável por 15 pelo menos cerca de um ano e, principalmente, é estável por mais de cerca de um ano, por exemplo, pelo menos cerca de dois anos ou pelo menos cerca de três anos.

A estabilidade pode ser medida com base na habilidade da solução aquosa com ORP para permanecer adequada por um 20 ou mais usos, por exemplo, para inibir a degranulação de mastócitos, inibir a secreção de citocina, descontaminação, desinfecção, esterilização, limpeza antimicrobiana e limpeza de feridas, por um período de tempo especificado após sua preparação sob condições normais de estocagem (por 25 exemplo, temperatura ambiente). A estabilidade da solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode ser medida por estocagem sob condições aceleradas, por exemplo, de cerca de 30°C a cerca de 60°C, nas quais uma solução aquosa com ORP preferivelmente é estável por até 30 cerca de 90 dias e, mais preferivelmente, por até cerca de

180 dias.

A estabilidade também pode ser medida com base na concentração ao longo de tempo de uma ou mais espécies (ou precursores destas) presentes em solução durante o prazo de validade da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, as concentrações de uma ou mais espécies, por exemplo, cloro livre são mantidas a cerca de 70% ou mais de sua concentração inicial por pelo menos cerca de dois meses após preparação da solução aquosa com ORP. Mais preferivelmente, a concentração de uma ou mais dessas espécies é mantida em cerca de 80% ou mais de sua concentração inicial por pelo menos cerca de dois meses após preparação da solução aquosa com ORP. Ainda mais preferivelmente, a concentração de uma ou mais destas espécies é mantida em cerca de 90% ou mais e, principalmente, é mantida em cerca de 95% ou mais de sua concentração inicial por pelo menos cerca de dois meses após preparação da solução aquosa com ORP.

A estabilidade também pode ser determinada com base na redução na quantidade de organismos presentes em uma amostra após exposição à solução aquosa com ORP. A medida da redução da concentração de organismo pode ser feita com base em qualquer organismo adequado, incluindo, por exemplo, bactérias, fungos, leveduras ou vírus. Exemplos de organismos que podem ser usados para determinação da estabilidade podem incluir, por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Bacillus atrophaeus* (anteriormente *B. subtilis*).

A estabilidade também pode ser determinada com base na redução na quantidade de endotoxinas (por exemplo,

lipopolissacarídeos), fatores de crescimento, citocinas e outras proteínas e lipídeos presentes em uma amostra após exposição à solução aquosa com ORP.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode funcionar como um desinfetante de nível baixo capaz de uma redução de log quatro ( $10^4$ ) na concentração de microorganismos vivos, e também pode funcionar como um desinfetante de nível elevado capaz de uma redução de log seis ( $10^6$ ) na concentração de microorganismos vivos.

Preferivelmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é capaz de gerar uma redução pelo menos cerca de log quatro ( $10^4$ ) na concentração total de organismo, após exposição por um minuto, quando medida pelo menos cerca de dois meses após a preparação da solução.

Mais preferivelmente, a solução aquosa com ORP é capaz de uma redução de  $10^4$ - $10^6$  da concentração de organismo, quando medida pelo menos cerca de seis meses após a preparação da solução. Ainda mais preferivelmente, a solução aquosa com ORP é capaz de uma redução de  $10^4$ - $10^6$  da concentração de organismo, quando medida pelo menos cerca de um ano após preparação da solução aquosa com ORP e, principalmente, quando medida mais de cerca de um ano, por exemplo, pelo menos cerca de dois anos ou pelo menos cerca de três anos, após preparação da solução aquosa com ORP.

Por exemplo, a solução aquosa com ORP é capaz de uma redução pelo menos cerca de log cinco ( $10^5$ ) na concentração de uma amostra de microorganismo vivo selecionado do grupo que consiste em *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter baumannii*, espécies de *Acinetobacter*, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter*

*aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE, MDR), *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*,

5      *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, em 30 segundos de exposição, quando medida pelo

10     menos dois meses após preparação da solução aquosa com ORP.

Em uma modalidade, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode reduzir uma amostra de microorganismos vivos incluindo, sem limitação, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, a partir de uma concentração inicial de cerca de  $1 \times 10^6$  a cerca de  $1 \times 10^8$  organismos/ml até uma concentração final de cerca de zero organismo/ml em um intervalo de cerca de um minuto de exposição, quando medida pelo menos cerca de dois meses

15     após preparação da solução aquosa com ORP. Isso corresponde a de cerca de uma redução de log seis ( $10^6$ ) a uma redução de cerca de log oito ( $10^8$ ) na concentração de organismo. Preferivelmente, a solução aquosa com ORP é capaz de obter uma redução de  $10^6$ - $10^8$  de organismos *Escherichia coli*,

20     *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou *Candida albicans*, quando medida pelo menos cerca de seis meses após preparação e, mais preferivelmente, quando medida pelo menos cerca de um ano após preparação.

Alternativamente, a solução aquosa com ORP

30     administrada de acordo com a presente invenção pode

produzir uma redução de cerca de log seis ( $10^6$ ) na concentração de uma suspensão de esporos de esporos de *Bacillus athrophaeus* em um intervalo de até cinco minutos de exposição, quando medida pelo menos cerca de dois meses 5 após preparação da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode obter uma redução de cerca de  $10^6$  na concentração de esporos de *Bacillus athrophaeus*, quando medida pelo menos cerca de seis meses após preparação e, 10 mais preferivelmente, quando medida pelo menos cerca de um ano após preparação.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode produzir uma redução de cerca de log quatro ( $10^4$ ) na concentração de uma suspensão de esporos de 15 esporos de *Bacillus athrophaeus* em um intervalo de até cerca de trinta (30) segundos de exposição, quando medida pelo menos cerca de dois meses após preparação da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, a solução aquosa com ORP pode obter essa redução na concentração de esporos de 20 *Bacillus athrophaeus*, quando medida pelo menos cerca de seis meses após preparação e, mais preferivelmente, quando medida pelo menos cerca de um ano após preparação.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ainda produzir uma redução de cerca de log 25 seis ( $10^6$ ) na concentração de esporos fúngicos como, por exemplo, esporos de *Aspergillus niger*, em um intervalo de até cerca de cinco a cerca de dez minutos de exposição, quando medida pelo menos cerca de dois meses após preparação da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, a 30 solução aquosa com ORP pode obter uma redução de  $10^6$  na

concentração de esporos fúngicos, quando medida pelo menos cerca de seis meses após preparação e, mais preferivelmente, quando medida pelo menos cerca de um ano após preparação.

5 A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ainda produzir uma redução de mais de log 3 ( $10^3$ ) na concentração de vírus, como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e adenovírus, em um intervalo de até cerca de cinco a cerca de dez minutos de exposição,  
10 quando medida pelo menos cerca de dois meses após preparação da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, a solução aquosa com ORP pode obter uma redução  $> 10^3$  na concentração de vírus, quando medida pelo menos cerca de seis meses após preparação e, mais preferivelmente, quando  
15 medida pelo menos cerca de um ano após preparação.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode inibir completamente o crescimento de *Mycobacterium bovis* em um intervalo de até cinco minutos de exposição, quando medida pelo menos cerca de dois meses  
20 após preparação da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, a solução aquosa com ORP pode obter a inibição total na concentração de *Mycobacteria*, quando medida pelo menos cerca de seis meses após preparação e, mais preferivelmente, quando medida pelo menos cerca de um ano  
25 após preparação.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ser ácida, neutra ou básica e, geralmente, pode ter um pH de cerca de 1 a cerca de 14. Dentro dessa faixa de pH, a solução aquosa com ORP pode ser aplicada com  
30 segurança em quantidades adequadas, por exemplo, às

superfícies, sem danificar as superfícies ou prejudicar objetos como, por exemplo, a pele humana, que entram em contato com uma solução aquosa com ORP. Preferivelmente, o pH da solução aquosa com ORP administrada de acordo com a 5 invenção é de cerca de 3 a cerca de 8. Mais preferivelmente, o pH da solução aquosa com ORP é de cerca de 6,4 a cerca de 7,8 e, ainda mais preferivelmente, o pH é de cerca de 7,4 a cerca de 7,6.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a 10 invenção pode ter um potencial de oxirredução de cerca de -1.000 milivolts (mV) a cerca de +1150 milivolts (mV). Esse potencial é uma medida da tendência (ou seja, o potencial) de uma solução para aceitar ou transferir elétrons que são percebidos por um eletrodo metálico, comparado com um 15 eletrodo de referência na mesma solução. Esse potencial pode ser medido por técnicas padronizadas que incluem, por exemplo, a medida do potencial elétrico em milivolts da solução aquosa com ORP em relação a referência-padrão como, por exemplo, um eletrodo de prata/cloreto de prata.

20 A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção preferivelmente possui um potencial de cerca de -400 mV a cerca de +1.300 mV. Mais preferivelmente, a solução aquosa com ORP possui um potencial de cerca de 0 mV a cerca de +1.250 mV e, ainda mais preferivelmente, de 25 cerca de +500 mV a cerca de +1.250 mV. Ainda mais preferivelmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção possui um potencial de cerca de +800 mV a cerca de +1.100 mV e, principalmente, de cerca de +800 mV a cerca de +1.000 mV.

30 Várias espécies iônicas e outras espécies podem estar

presentes na solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção. Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode conter cloro (por exemplo, cloro livre). Acredita-se que a presença de uma ou mais dessas espécies contribua pelo 5 menos para a habilidade desinfetante da solução aquosa com ORP para matar diversos microorganismos, por exemplo, bactérias e fungos, além de vírus. Sem se fixar a nenhuma teoria específica, acredita-se que uma ou mais destas espécies também possam contribuir para a eficácia da 10 solução aquosa com ORP para o tratamento ou a prevenção de sinusite.

Cloro livre tipicamente inclui, sem limitação, ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), íons hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ), hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ ), íon cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), gás cloro dissolvido 15 ( $\text{Cl}_2$ ), e precursores destes. A proporção de ácido hipocloroso para íons hipoclorito depende do pH. Em um pH de 7,4, os níveis de ácido hipocloroso são tipicamente de cerca de 25 ppm a cerca de 75 ppm. A temperatura também pode influenciar a proporção do componente de cloro livre.

20 Cloro pode estar presente na solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção em qualquer quantidade adequada. Os níveis desses componentes podem ser medidos por qualquer método adequado, incluindo métodos conhecidos na técnica.

25 Preferivelmente, o teor total de cloro, que inclui tanto cloro livre quanto cloro ligado, é de cerca de 50 partes por milhão (ppm) a cerca de 400 ppm. Mais preferivelmente, o teor total de cloro é de cerca de 80 ppm a cerca de 150 ppm.

30 O teor de cloro pode ser medido por métodos conhecidos

na técnica como, por exemplo, o método do colorímetro de DPD (Lamotte Company, Chestertown, Maryland) ou outros métodos conhecidos como, por exemplo, métodos estabelecidos pela "Environmental Protection Agency". No método do colorímetro de DPD, é formada uma cor amarela pela reação de cloro livre com N,N-dietil-p-fenilediamina (DPD), e a intensidade é medida com um calorímetro calibrado que fornece o resultado em partes por milhão. A adição adicional de iodeto de potássio dá uma solução uma cor rosa para fornecer o valor do cloro total. A quantidade de cloro ligado presente é então determinada por subtração do cloro livre do cloro total.

A quantidade total de espécies químicas oxidantes presente na solução aquosa com ORP está preferivelmente na faixa de cerca de 2 milimolar (mM), que inclui a espécie de cloro anteriormente mencionada, a espécie de água superoxidata e espécies adicionais, incluindo aquelas que são de difícil medição como, por exemplo,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{ClO}_3$ ,  $\text{Cl}_2^-$ , e  $\text{ClO}_x$ .

Em uma modalidade, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção compreende uma ou mais espécies de cloro e/ou uma ou mais espécies adicionais de água superoxidata. Preferivelmente, uma espécie de cloro presente é uma espécie de cloro livre. A espécie de cloro livre pode incluir uma ou mais espécies selecionadas do grupo que consiste em ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), íons hipoclorito ( $\text{OCl}$ ), hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ ), íon cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), gás cloro dissolvido ( $\text{Cl}_2$ ), precursores destes e misturas destes.

A quantidade total de espécie de cloro livre é

preferivelmente de cerca de 10 ppm a cerca de 400 ppm, mais preferivelmente, de cerca de 50 ppm a cerca de 200 ppm e, principalmente, de cerca de 50 ppm a cerca de 80 ppm. A quantidade de ácido hipocloroso é preferivelmente de cerca de 15 ppm a cerca de 35 ppm. A quantidade de hipoclorito de sódio está preferivelmente na faixa de cerca de 25 ppm a cerca de 50 ppm.

Em uma modalidade, a solução aquosa com ORP inclui uma ou mais espécies de cloro ou uma e, opcionalmente, ou mais precursores destes, e é estável por pelo menos cerca de 24 horas, preferivelmente por pelo menos cerca de uma semana, mais preferivelmente, por cerca de pelo menos dois meses e, ainda mais preferivelmente, por pelo menos cerca de seis meses após sua preparação. Ainda mais preferivelmente, esta solução aquosa com ORP é estável por pelo menos cerca de um ano e, principalmente, por mais de cerca de um ano, por exemplo, pelo menos cerca de dois anos ou pelo menos cerca de três anos.

Prefere-se também que a solução aquosa com ORP, que inclui uma ou mais espécies de cloro, uma ou mais espécies adicionais de água superoxidata (por exemplo, uma ou mais espécies de oxigênio, oxigênio dissolvido) ou um ou mais precursores destas e possua um pH de cerca de 6 a cerca de 8. Mais preferivelmente, o pH de esta solução aquosa com ORP é de cerca de 6,2 a cerca de 7,8 e, principalmente, de cerca de 7,4 a cerca de 7,6. Uma solução aquosa com ORP exemplar administrada de acordo com a presente invenção pode compreender, por exemplo, de cerca de 15 ppm a cerca de 35 ppm de ácido hipocloroso, de cerca de 25 ppm a cerca de 50 ppm de hipoclorito de sódio, com esses componentes em

um pH de cerca de 6,2 a cerca de 7,8, e pode ser estável por pelo menos cerca de uma semana, por exemplo, pelo menos cerca de dois meses, pelo menos cerca de seis meses, pelo menos cerca de um ano, ou mais do que cerca de um ano, por 5 exemplo, pelo menos cerca de dois anos ou pelo menos cerca de três anos.

Embora sem limitar de forma alguma a presente invenção, acredita-se que o controle do pH e de outras variáveis (por exemplo, salinidade) possa fornecer soluções 10 de água com ORP estáveis, que contêm uma ou mais espécies de cloro e, opcionalmente, peróxido de hidrogênio ou precursores destes como, por exemplo, ácido hipocloroso e íons hipoclorito.

As soluções de água com ORP administradas de acordo 15 com a invenção preferivelmente compreende uma ou mais espécies de água oxidata que podem gerar radicais livres (como, por exemplo, radicais hidroxila) ao serem expostas ao ferro. A água ORP pode opcionalmente incluir um ou mais compostos químicos gerados durante a produção desta como, 20 por exemplo, hidróxido de sódio (NaOH), dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), peróxidos (por exemplo, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e ozônio ( $\text{O}_3$ ) embora tenha sido relatado que hidróxido de sódio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio e ozônio possam reagir com hipoclorito 25 resultando no seu consumo e na produção de outras espécies químicas.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção pode ser produzida por um processo de oxirredução, por exemplo, por um processo eletrolítico ou 30 reação redox, em que a energia elétrica é usada para

produzir uma ou mais alterações químicas em uma solução aquosa. Processos exemplares para a preparação de soluções de água com ORP adequadas são descritos, por exemplo, nas Publicações de Pedidos de Patentes U.S. Nos US 2005/0139808 5 e US 2005/0142157 (aqui incorporadas por referência).

No processo eletrolítico, a energia elétrica é introduzida e transportada através da água pela condução de carga elétrica de um ponto a outro na forma de uma corrente elétrica. Para que a corrente elétrica surja e subsista, 10 deve haver transportadores de carga na água, e deve haver uma força que faça com que os transportadores se movam. Os transportadores de carga podem ser elétrons, como no caso de metal e semicondutores, ou podem ser íons positivos e negativos, no caso de soluções. Uma reação de redução 15 ocorre no catodo, enquanto uma reação de oxidação ocorre no anodo. Pelo menos algumas das reações redutoras e oxidativas que supostamente ocorrem são descritas no Pedido Internacional WO 03/048421 A1.

Como aqui usada, água produzida em um anodo é 20 denominada água oxidada (*anode water*) e água produzida em um catodo é denominada água reduzida (*cathode water*). Água oxidada tipicamente contém espécies oxidadas produzidas pela reação eletrolítica, enquanto água reduzida tipicamente contém espécies reduzidas pela reação. Água 25 oxidada geralmente possui um pH baixo, tipicamente de cerca de 1 a cerca de 6.8. A água oxidada preferivelmente contém cloro em várias formas incluindo, por exemplo, gás cloro, íons cloreto, ácido clorídrico e/ou ácido hipocloroso, ou um ou mais precursores destes. Oxigênio em várias formas 30 está também preferivelmente presente incluindo, por

exemplo, gás oxigênio e, opcionalmente, peróxidos e/ou ozônio, ou um ou mais precursores destes. Água reduzida geralmente possui um pH elevado, tipicamente de cerca de 7,2 a cerca de 11. Água reduzida pode conter gás hidrogênio, radicais hidroxila e/ou íons sódio.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode incluir uma mistura de água oxidada (por exemplo, água produzida na câmara anódica de uma célula eletrolítica) e água reduzida (por exemplo, água produzida na câmara catódica de uma célula de eletrólise). Preferivelmente, a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção contém água reduzida, por exemplo, em uma quantidade de cerca de 10% por volume a cerca de 90% por volume da solução. Mais preferivelmente, água reduzida está presente na solução aquosa com ORP em uma quantidade de cerca de 10% por volume a cerca de 50% por volume e, ainda mais preferivelmente, em uma quantidade de cerca de 20% por volume a cerca de 40% por volume da solução, por exemplo, de cerca de 20% por volume a cerca de 30% por volume da solução. Adicionalmente, a água oxidada pode estar presente na solução aquosa com ORP, por exemplo, em uma quantidade de cerca de 50% por volume a cerca de 90% por volume da solução. Soluções de água com ORP exemplares podem conter de cerca de 10% por volume a cerca de 50% por volume de água reduzida e de cerca de 50% por volume a cerca de 90% por volume de água oxidada. A água oxidada e a água reduzida podem ser produzidas com a utilização da célula de eletrólise de três câmaras mostrada na FIG. 1.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção é produzida preferivelmente com o uso de pelo

menos uma célula de eletrólise que compreende uma câmara de anódica, uma câmara catódica e uma câmara de solução salina localizada entre as câmaras anódica e catódica, em que pelo menos um pouco da água oxidada e de água reduzida é combinado, a fim de que a solução aquosa com ORP compreenda água oxidada e água reduzida. Um diagrama de uma célula de eletrólise de três câmaras exemplar que pode ser usada na preparação de uma solução aquosa com ORP exemplar é mostrado na FIG. 2.

A célula de eletrólise 100 possui uma câmara anódica 102, uma câmara catódica 104 e uma câmara de solução salina 106. A câmara de solução salina está localizada entre a câmara anódica 102 e câmara catódica 104. A câmara anódica 102 possui um local de entrada 108 e um local de saída 110 para permitir o fluxo de água através da câmara anódica 100. A câmara catódica 104 similarmente possui um local de entrada 112 e um local de saída 114 para permitir o fluxo de água através da câmara catódica 104. A câmara de solução salina 106 possui um local de entrada 116 e um local de saída 118. A célula de eletrólise 100 preferivelmente inclui uma caixa para manter todos os componentes juntos.

A câmara anódica 102 é separada da câmara de solução salina por um eletrodo anódico 120 e uma membrana de troca iônica aniônica 122. O eletrodo anódico 120 pode ser posicionado adjacente à câmara anódica 102 com a membrana 122 localizada entre o eletrodo anódico 120 e a câmara de solução salina 106. Alternativamente, a membrana 122 pode ser posicionada adjacente à câmara anódica 102 com o eletrodo anódico 120 localizado entre a membrana 122 e a câmara de solução salina 106.

A câmara catódica 104 é separada da câmara de solução salina por um eletrodo catódico 124 e uma membrana de troca iônica catódica 126. O eletrodo catódico 124 pode ser posicionado adjacente à câmara catódica 104 com a membrana 126 localizada entre o eletrodo catódico 124 e a câmara de solução salina 106. Alternativamente, a membrana 126 pode ser posicionada adjacente à câmara catódica 104 com o eletrodo catódico 124 localizado entre a membrana 126 e a câmara de solução salina 106.

Os eletrodos preferivelmente são construídos de metal para permitir que seja aplicado um potencial de voltagem entre a câmara anódica e câmara de catódica. Os eletrodos metálicos são geralmente planos e possuem dimensões e área de superfície do corte transversal similares àquelas das membranas de troca iônica. Os eletrodos são configurados para expor uma porção substancial da superfície dos componentes de troca iônica à água em suas respectivas câmaras anódica e catódica. Isso permite a migração de espécies iônicas entre a câmara de solução salina, câmara anódica e câmara de catódica. Preferivelmente, os eletrodos possuem diversas passagens ou aberturas espaçadas igualmente através da superfície dos eletrodos.

Uma fonte de potencial elétrico é conectada ao eletrodo anódico 120 e ao eletrodo catódico 124 de modo a induzir uma reação de oxidação na câmara anódica 102 e uma reação de redução na câmara catódica 104.

As membranas de troca iônica 122 e 126 usadas na célula de eletrólise 100 podem ser construídas de qualquer material adequado para permitir a troca de íons entre a câmara de solução salina 106 e a câmara anódica 102 como,

por exemplo, íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e entre a solução salina câmara de solução salina 106 e a câmara catódica 104 como, por exemplo, íons sódio ( $\text{Na}^+$ ). A membrana de troca iônica anódica 122 e membrana de troca iônica catódica 126 podem 5 ser feitas do mesmo material ou de um material de construção diferente. Preferivelmente, a membrana de troca iônica anódica compreende um polímero fluorado. Polímeros fluorados adequados incluem, por exemplo, polímeros e copolímeros de ácido perfluorsulfônico como, por exemplo, 10 copolímeros de ácido perfluorsulfônico/PTFE e copolímeros de ácido perfluorsulfônico/TFE. A membrana de troca iônica pode ser construída de uma camada única de material ou de múltiplas camadas. Polímeros de membrana de troca iônica adequados podem incluir um ou mais polímeros de membrana de 15 troca iônica comercializados sob o nome comercial Nafion®.

A fonte da água para a câmara anódica 102 e câmara catódica 104 da célula de eletrólise 100 pode ser qualquer suprimento de água adequado. A água pode ser de um suprimento municipal de água ou, alternativamente, pré- 20 tratada antes de ser utilizada na célula de eletrólise. Preferivelmente, a água é pré-tratada, e é selecionada do grupo que consiste em água amolecida, água purificada, água destilada e água deionizada. Mais preferivelmente, a fonte de água pré-tratada é água ultrapura obtida com uso de 25 equipamento de purificação por osmose reversa.

A solução salina aquosa para uso na câmara de água salina 106 pode incluir qualquer solução salina aquosa que contenha espécies iônicas adequadas para a produção da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, a solução salina 30 aquosa é uma solução salina aquosa de cloreto de sódio

(NaCl), também comumente denominada soro fisiológico. Outras soluções salinas adequadas podem incluir outros sais de cloreto como, por exemplo, cloreto de potássio, cloreto de amônio e cloreto de magnésio, além de outros sais de halogênios, tais como sais de potássio e bromo. A solução salina pode conter uma mistura de sais.

A solução salina pode ter qualquer concentração adequada. Por exemplo, a solução salina pode ser saturada ou concentrada. Preferivelmente, a solução salina é uma solução saturada de cloreto de sódio.

A FIG. 2 ilustra o que supostamente são várias espécies iônicas produzidas na célula de eletrólise de três câmaras útil em relação à invenção. A célula de eletrólise de três câmaras 200 inclui uma câmara anódica 202, uma câmara catódica 204 e uma câmara de solução salina 206. Mediante aplicação de uma corrente elétrica adequada ao anodo 208 e ao catodo 210, os íons presentes na solução salina seguem através da câmara de solução salina 206, migram através da membrana de troca iônica anódica 212 e da membrana de troca iônica catódica 214 para a água que flui através da câmara anódica 202 e da câmara catódica 204, respectivamente.

Os íons positivos migram da solução salina 216 que flui através da câmara de solução salina 206 para a água reduzida 218 que flui através da câmara catódica 204. Os íons negativos migram da solução salina 216 que flui através da câmara de solução salina 206 para a água oxidata 220 que flui através da câmara anódica 202.

Preferivelmente, a solução salina 216 é cloreto de sódio aquoso (NaCl), que contém tanto íons sódio ( $\text{Na}^+$ )

quanto íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) íons. Os íons  $\text{Na}^+$  positivos migram da solução salina 216 para a água reduzida 218. Os íons  $\text{Cl}^-$  negativos migram da solução salina 216 para a água oxidada 220.

5 Os íons sódio e os íons cloreto podem passar por uma reação adicional na câmara anódica 202 e na câmara catódica 204. Por exemplo, os íons cloreto podem reagir com vários íons oxigênio e outras espécies (por exemplo, radicais livres contendo oxigênio,  $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ) presentes na água oxidada 10 220 para produzir  $\text{ClO}_n^-$  e  $\text{ClO}^-$ . Também podem ocorrer outras reações na câmara anódica 202 incluindo a formação de radicais livres de oxigênio, íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), oxigênio (por exemplo, como  $\text{O}_2$ ) e, opcionalmente, ozônio ( $\text{O}_3$ ) e peróxidos. Na câmara catódica 204, gás hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), 15 íons hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) e outros radicais e, opcionalmente, hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) podem ser formados.

O aparelho para a produção da solução aquosa com ORP também pode ser construído para incluir pelo menos duas células de eletrólise de três câmaras. Cada uma das células 20 eletrolíticas inclui uma câmara de anódica, uma câmara de catódica e uma câmara de solução salina que separa as câmaras anódica e catódica. O aparelho inclui um tanque de mistura para coleta da água oxidada produzida pelas células eletrolíticas e uma porção da água reduzida produzida por 25 uma ou mais das células eletrolíticas. Preferivelmente, o aparelho ainda inclui um sistema de recirculação de sal para permitir a reciclagem da solução salina fornecida às câmaras de solução salina das células eletrolíticas. Um diagrama de um processo exemplar para a produção de uma 30 solução aquosa com ORP com o uso de duas células de

eletrolise é mostrado na FIG. 3.

O processo 300 inclui duas células eletrolíticas de três câmaras, especificamente uma primeira célula eletrolítica 302 e uma segunda célula eletrolítica 304. A 5 água é transferida, bombeada ou de algum outro modo fornecida da fonte de água 305 para a câmara anódica 306 e câmara catódica 308 da primeira célula eletrolítica 302 e para a câmara anódica 310 e câmara catódica 312 da segunda célula eletrolítica 304. Vantajosamente, esse processo pode 10 produzir de cerca de 1 litro/minuto a cerca de 50 litros/minuto de solução aquosa com ORP. A capacidade de produção pode ser aumentada com a utilização de células eletrolíticas adicionais. Por exemplo, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais células eletrolíticas 15 de três câmaras podem ser usadas para aumentar o volume da solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção.

A água oxidada produzida na câmara anódica 306 e na câmara anódica 310 são coletadas no tanque de mistura 314. 20 Uma porção da água reduzida produzida na câmara catódica 308 e na câmara catódica 312 é coletada no tanque de mistura 314 e combinada com a água oxidada. A porção restante de água reduzida produzida no processo é descartada. A água reduzida pode opcionalmente ser 25 submetida a um separador de gás 316 e/ou separador de gás 318, antes da adição ao tanque de mistura 314. Os separadores de gás removem gases como, por exemplo, gás hidrogênio, que são formados na água reduzida durante o processo de produção.

30 O tanque de mistura 314 pode opcionalmente ser

conectado e uma bomba de recirculação 315 para permitir a mistura homogênea da água oxidada e de uma porção da água reduzida das células de eletrólise 302 e 304. Além disso, o tanque de mistura 314 pode opcionalmente incluir 5 dispositivos adequados para o monitoramento do nível e do pH da solução aquosa com ORP. A solução aquosa com ORP pode ser transferida do tanque de mistura 314 por meio da bomba 317 para aplicação na desinfecção ou esterilização no tanque ou próximo à localização do tanque de mistura. 10 Alternativamente, a solução aquosa com ORP pode ser liberada em um ou mais recipientes adequados para envio para um local distante (por exemplo, depósito, hospital etc.).

O processo 300 ainda inclui um sistema de recirculação 15 de solução salina para fornecer a solução salina à câmara de solução salina 322 da primeira célula eletrolítica 302 e a câmara de solução salina 324 da segunda célula eletrolítica 304. A solução salina é preparada no tanque de sal 320. O sal é transferido por meio da bomba 321 para as 20 câmaras de solução salina 322 e 324. Preferivelmente, a solução salina flui em série, primeiro através da câmara de solução salina 322, seguida pela câmara de solução salina 324. Alternativamente, a solução salina pode ser bombeada para ambas as câmaras de solução salina simultaneamente.

25 Antes de retornar ao tanque de sal 320, a solução salina pode fluir através de um trocador de calor 326 no tanque de mistura 314 para controlar a temperatura da solução aquosa com ORP, como necessário.

Os íons presentes na solução salina são eliminados ao 30 longo de tempo na primeira célula eletrolítica 302 e na

segunda célula eletrolítica 304. Uma fonte de íons adicional pode ser adicionada periodicamente ao tanque de mistura 320 para substituir os íons que são transferidos para a água oxidada e água reduzida. A fonte de íons adicional pode ser usada, por exemplo, para manter um pH constante da solução salina, que pode cair (ou seja, se tornar ácido) ao longo de tempo. A fonte adicional de íons pode ser qualquer composto adequado incluindo, por exemplo, sais como, por exemplo, cloreto de sódio. Preferivelmente, hidróxido de sódio é adicionado ao tanque de mistura 320 para substituir os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) que são transferidos para a água oxidada e água reduzida.

Após sua preparação, a solução aquosa com ORP pode ser transferida para um ou mais recipientes adequados, por exemplo, um recipiente lacrado para distribuição e venda para os usuários finais como, por exemplo, instalações de assistência médica incluindo, por exemplo, hospitais, casas de repouso, consultórios médicos, centros de cirurgia ambulatorial, consultórios dentários, e semelhantes. Recipientes adequados podem incluir, por exemplo, um recipiente lacrado que mantém a esterilidade e estabilidade da solução aquosa com ORP contida no recipiente. O recipiente pode ser construído de qualquer material que seja compatível com a solução aquosa com ORP. Preferivelmente, o recipiente é geralmente não reativo com um ou mais íons ou outras espécies presentes na solução aquosa com ORP.

Preferivelmente, o recipiente é construído de plástico ou vidro. O plástico pode ser rígido a fim de que o recipiente seja capaz de ser armazenado em uma prateleira.

Alternativamente, o recipiente pode ser flexível, por exemplo, um recipiente feito de plástico flexível como, por exemplo, uma bolsa flexível.

Plásticos adequados podem incluir, por exemplo, 5 polipropileno, tereftalato de poliéster (PET), poliolefina, cicloolefina, policarbonato, resina ABS, polietileno, cloreto de polivinila, e misturas destes. Preferivelmente, o recipiente compreende um ou mais polietilenos selecionados do grupo que consiste em 10 polietileno de alta densidade (HDPE), polietileno de baixa densidade (LDPE), e polietileno linear de baixa densidade (LLDPE). Mais preferivelmente, o recipiente é construído de polietileno de alta densidade.

O recipiente preferivelmente tem uma abertura para 15 permitir a distribuição da solução aquosa com ORP. O abertura do recipiente pode ser lacrada por qualquer modo adequado. Por exemplo, o recipiente pode ser lacrado com uma tampa ou rolha de rosca. Opcionalmente, a abertura pode ainda ser lacrada com uma camada de folha metálica.

20 O gás do *headspace* do recipiente lacrado pode ser ar ou qualquer outro gás adequado, que preferivelmente não reaja com uma ou mais espécies na solução aquosa com ORP. Gases do *headspace* adequados podem incluir, por exemplo, nitrogênio, oxigênio, e misturas destes.

25 A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção também pode ser usada para o tratamento ou a prevenção de inflamação mediada por célula e inflamação resultante de uma reação autoimune, incluindo, sem limitação, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite 30 autoimune, sarcoidose, doença inflamatória do intestino,

artrite reumatóide, e febre reumática. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção pode ser usada para o tratamento ou a prevenção de inflamação resultante de infecção, por exemplo, de uma infecção por um 5 ou mais microorganismos selecionados do grupo que consiste em vírus, bactérias e fungos, incluindo hipersensibilidade e inflamação com mediação autoimune causada por infecção.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção também pode ser usada para o tratamento 10 ou a prevenção de inflamação associada a uma condição do trato respiratório superior. Quando a inflamação é associada com uma condição do trato respiratório superior, a solução aquosa com ORP é administrada preferivelmente à via aérea superior, por exemplo, como um spray, névoa, 15 aerossol ou vapor, de modo a colocar em contato um ou mais tecidos da via aérea superior afetados pela condição. Qualquer método adequado pode ser empregado para a liberação da solução aquosa com ORP à via aérea superior, de modo a tratar ou evitar uma ou mais condições do trato 20 respiratório superior de acordo com a presente invenção, incluindo uma ou mais vias de administração aqui descritas.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção também pode ser usada para prevenção ou tratamento de inflamação que afeta um ou mais tecidos da 25 via aérea respiratória superior (por exemplo, nasal tecido, como aqui descrito) ou tecidos pulmonares. Estas condições podem incluir, por exemplo, faringite, asma, e semelhantes, que são evitáveis ou tratáveis com a solução ORP administrada de acordo com a invenção.

30 Com relação à faringite, estima-se que em todo o

mundo, 1 a 2% de todas as consultas a consultórios médicos, clínicas e salas de emergência sejam motivadas por faringite. Nos Estados Unidos e no México, acredita-se que faringite e amidalite sejam responsáveis por cerca de 15 e 5 12 milhões de consultas por ano, respectivamente. Esses casos são tipicamente causados por várias bactérias e vírus. Além disso, faringite e amidalite causadas por *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A pode aumentar significativamente o risco de febre reumática em populações 10 pobres; no entanto, acredita-se que somente 5 a 15% dos casos de faringite sejam causados por essa bactéria, e que o resto dos casos agudos seja causado por bactérias e vírus de pouca relevância epidemiológica. Esses últimos casos 15 tendem a ser autolimitados em poucos dias e não deixam seqüelas.

Verificou-se que um grande número de médicos em todo o mundo prescreve antibióticos indiscriminadamente para faringite aguda. Isso ocorre na prática diária, freqüentemente porque os pacientes tendem a solicitar 20 antibióticos potentes. Infelizmente, é difícil estabelecer um diagnóstico preciso de faringite/amidalite estreptocócica clinicamente e a relação custo/benefício de se tratar faringite aguda/amidalite com antibióticos é questionável. Em alguns países como México, há um gasto 25 significativo de fontes governamentais para cobrir o custo de antibióticos, e para cobrir perdas associadas com dias de trabalho perdidos como um resultado de doença, todos esses representam uma perda significativa com relação ao orçamento nacional.

30 Acredita-se que uma solução aquosa com ORP

administrada de acordo com a presente invenção possa fornecer uma terapia adjuvante segura e eficaz e com custo compensador para o tratamento ou prevenção de faringite e/ou amidalite aguda. O tratamento empírico de 5 faringite/amidalite aguda pode começar com a administração de uma solução aquosa com ORP de acordo com a presente invenção e, dependendo da evolução ou do resultado do teste rápido para *Streptococcus*, podem ser iniciados antibióticos após 48-72 horas, somente se necessário. Dessa forma, uma 10 solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção permite que o uso de antibióticos seja adiado e, ao mesmo tempo, reduz a sintomatologia do paciente e acelera a recuperação do paciente, caso a faringite/amidalite não seja por *Streptococcus* do grupo A. 15 O uso adjuvante da solução aquosa com ORP de acordo com a presente invenção com antibióticos para o tratamento de faringite/amidalite estreptocócica também pode encurtar o período de resposta clínica e diminuir a incidência de recorrências.

20 A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção também pode ser usada para o tratamento ou a prevenção de inflamação associada à hipersensibilidade. Historicamente, reações de hipersensibilidade foram classificadas como um entre quatro 25 tipos, dos quais pode surgir doença significativa. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ser usada para tratar e/ou evitar (e.g., inibir o surgimento de, inibir a progressão de ou diminuir a probabilidade de) uma ou mais destas reações. A 30 hipersensibilidade do Tipo I tipicamente resulta da

combinação de um antígeno com um anticorpo ligado a um mastócito ou basófilo (veja Kumar e cols., Robbins & Cotran "Pathologic Basis of Disease", 2004, pp. 193-268, que é aqui incorporado por referência). As reações do Tipo I ocorrem 5 em um intervalo de minutos de exposição ao antígeno em indivíduos que foram sensibilizados previamente ao antígeno. Em seres humanos, as reações do Tipo I são mediadas por IgE, que possui receptores Fc de alta afinidade em mastócitos e basófilos.

10 O papel dos mastócitos na hipersensibilidade do Tipo I é especialmente importante, pois eles residem em tecidos sob a superfície epitelial próximo aos vasos sanguíneos e nervos. Vários sintomas clínicos observados na dermatite atópica, rinite alérgica e asma atópica são produzidos por 15 estimulação IgE-antígeno de mastócitos localizados em diferentes tecidos afetados. A visão aceita atualmente da patogênese da asma atópica é que alérgenos iniciam o processo pelo acionamento de mastócitos pulmonares que abrigam IgE (MCs) para a liberação de mediadores como, por 20 exemplo, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, cininas, fator de ativação de plaquetas (PAF) etc. na denominada fase inicial da reação (Kumar e cols., pp. 193-268). Por sua vez, esses mediadores induzem broncoconstricção e aumentam a permeabilidade vascular e a produção de muco. De 25 acordo com esse modelo, após a ativação de mastócitos, aquelas células secretam várias citocinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-4, IL-5 e IL-6, que participam no recrutamento e na ativação locais de outras células inflamatórias como, por exemplo, eosinófilos, 30 basófilos, linfócitos T, plaquetas e fagócitos

mononucleares. Essas células recrutadas, por sua vez, contribuem para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória que pode então se tornar autônoma e agravar os sintomas asmáticos. Essa resposta da fase tardia constitui 5 processo inflamatório de longa duração que irá induzir alterações nos tecidos circundantes (veja Kumar e cols., pp. 193-268). Clinicamente, as reações do Tipo I podem ter efeitos locais como, por exemplo, rinite alérgica, ou efeitos sistêmicos como os encontrados na anafilaxia, que se 10 manifestam com coceira, urticária, sofrimento respiratório e colapso circulatório.

A hipersensibilidade do Tipo II é mediada por anticorpos dirigidos aos抗ígenos nas superfícies de células e no espaço extracelular. Esses anticorpos podem 15 dirigir a lise celular ou causar a opsonização das moléculas-alvo (preparação para a fagocitose por outras células). Alternativamente, os anticorpos podem ser dirigidos para e ativar receptores da superfície celular. As condições que resultam de reações do Tipo II incluem 20 reações a transfusões, doença de Graves (tireotoxicose), reações a fármacos, anemia perniciosa e febre reumática aguda. Na febre reumática, os anticorpos são formados contra抗ígenos estreptocócicos, mas apresentam reação cruzada com tecidos humanos como, por exemplo, válvulas 25 cardíacas.

A hipersensibilidade do Tipo III é causada por complexos imunes, que são combinações de anticorpos e outras proteínas do sistema imunológico do hospedeiro, mais tipicamente proteínas do complemento. É a função normal dos 30 anticorpos se ligar e ativar complemento. No entanto,

quando os complexos imunes macromoleculares resultantes não são processados adequadamente, eles podem produzir dano tecidual persistente. Macrófagos e PMNLs podem ser ativados por complexos imunes e induzir a liberação de substâncias químicas tóxicas por essas células. As reações ao complexo imune podem ser locais e podem causar condições como, por exemplo, uma reação artro, ou causar doença sistêmica como, por exemplo, doença do soro ou alguns dos aspectos do lúpus eritematoso sistêmico (LES).

A hipersensibilidade do Tipo IV é mediada por células e é denominada algumas vezes hipersensibilidade do tipo retardada. A hipersensibilidade do Tipo IV é mediada por linfócitos T e freqüentemente resulta na formação de uma reação granulomatosa. Em uma reação granulomatosa, uma forma de macrófago denominada uma célula epitelióide tenta, mas não consegue, digerir um antígeno. A persistência do antígeno leva à liberação de citocinas que atraem linfócitos adicionais, resultando em focos crônicos de inflamação. Os focos possuem concentrações elevadas de linfócitos T citotóxicos que liberam granzimas e perforinas que são tóxicas para as células adjacentes. A hipersensibilidade do Tipo IV é um componente proeminente de doenças autoimunes como, por exemplo, síndrome de Sjögren, sarcoidose e dermatite de contato.

Estados patológicos podem combinar diferentes tipos de reações de hipersensibilidade. Em doenças autoimunes,抗ígenos do hospedeiro estimulam a hipersensibilidade com consequências sérias para o hospedeiro. Por exemplo, no lúpus eritematoso sistêmico,抗ígenos do hospedeiro induzem reações do Tipo II contra células sanguíneas,

enquanto reações do Tipo III causam lesão dos vasos sanguíneos e glomerular renal. Além disso, as reações de hipersensibilidade também são observadas em condições iatrogênicas como, por exemplo, reações a fármacos e 5 rejeição a transplantes. A rejeição a transplantes inclui componentes de hipersensibilidade do Tipo II e Tipo IV.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode ser usada para a prevenção ou tratamento de uma infecção, por exemplo, por um ou mais 10 patógenos infecciosos como, por exemplo, microorganismos infecciosos. Estes microorganismos podem incluir, por exemplo, vírus, bactérias e fungos. O vírus pode incluir, por exemplo, um ou mais vírus selecionados do grupo que consiste em adenovírus, herpes vírus, coxsackie vírus, HIV, 15 rinovírus, coronavírus e vírus da gripe. As bactérias podem incluir, por exemplo, uma ou mais bactérias selecionadas do grupo que consiste em *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Mycobacterium tuberculosis*. Os fungos podem incluir, por exemplo, um ou 20 mais fungos selecionados do grupo que consiste em *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus atrophaeus*.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode ser eficaz contra adenovírus. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a 25 invenção obtém preferivelmente uma redução de log 10 na carga adenoviral acima de cerca de 2, mais preferivelmente, acima de cerca de 2,5 e, ainda mais preferivelmente, acima de cerca de 3, após exposição à solução aquosa com ORP por cerca de 20 minutos, mais preferivelmente, após exposição 30 por cerca de 15 minutos e, ainda mais preferivelmente, após

exposição por cerca de 10 minutos. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode ser eficaz para redução da carga viral de HIV-1, preferivelmente por um fator de redução de log acima de 5 cerca de 2, mais preferivelmente, por um fator de redução de log acima de cerca de 2,5 e, ainda mais preferivelmente, por um fator de redução de log acima de cerca de 3 após exposição à solução aquosa com ORP por cerca de 15 minutos, mais preferivelmente, após exposição por cerca de dez 10 minutos, ainda mais preferivelmente, após exposição por cerca de cinco minutos.

De acordo com o método da presente invenção, a administração da solução aquosa com ORP para a prevenção ou o tratamento de infecção também pode servir para evitar ou 15 tratar sinusite associada com a infecção (ou os tecidos afetados), como aqui descrito.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode ser usada para o tratamento de tecido lesionado ou danificado, por exemplo, por contato de um ou 20 mais tecidos debilitados ou danificados com uma quantidade terapeuticamente eficaz da solução aquosa com ORP. Qualquer método adequado pode ser usado para contato do tecido lesionado ou danificado, a fim de tratar o tecido lesionado ou danificado. Por exemplo, o tecido lesionado ou 25 danificado pode ser tratado por irrigação do tecido com a solução aquosa com ORP, a fim de colocar em contato o tecido lesionado ou danificado com uma quantidade terapeuticamente eficaz da solução aquosa com ORP. A solução aquosa com ORP pode ser administrada como um vapor 30 ou um spray, ou por aerossolização, nebulização ou

atomização, como aqui descrito, a fim de colocar em contato o tecido lesionado ou danificado com uma quantidade terapeuticamente eficaz da solução aquosa com ORP.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ser usada para o tratamento de tecidos que foram lesionados ou danificados, por exemplo, por cirurgia. Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser usada para o tratamento de tecidos que foram lesionados ou danificados por uma incisão. Além disso, a solução aquosa com ORP pode ser usada para o tratamento de tecidos que foram lesionados ou danificados por cirurgia oral, cirurgia de enxerto, cirurgia de implante, cirurgia de transplante, cauterização, amputação, radiação, quimioterapia, e combinações destes. A cirurgia oral pode incluir, por exemplo, dental cirurgia como, por exemplo, cirurgia de canal, extração dentária, cirurgia de gengiva, e semelhantes.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ser usada para o tratamento de tecidos que foram lesionados ou danificados por um ou mais de queimaduras, cortes, abrasões, arranhões, erupções cutâneas, úlceras, feridas puntiformes, combinações destes, e semelhantes, que não são necessariamente causadas por cirurgia. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ser usada para o tratamento de tecido lesionado ou danificado que esteja infectado, ou tecido lesionado ou danificado em consequência de infecção. Esta infecção pode ser causada por um ou mais patógenos infecciosos como, por exemplo, um ou mais microorganismos selecionados do grupo que consiste em vírus, bactérias e

fungos, como aqui descrito.

De acordo com a presente invenção, a administração da solução aquosa com ORP para o tratamento de tecido lesionado ou danificado também pode servir para evitar ou 5 tratar sinusite associada com o deterioração ou dano (ou com o tecido lesionado ou danificado) .

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção também pode ser usada como desinfetante para a erradicação de microorganismos, incluindo bactérias, vírus 10 e esporos, em diversos quadros, por exemplo, nos campos da assistência médica e de dispositivos médicos, para a desinfecção de superfícies e equipamentos médicos, e também pode ser aplicada no tratamento de feridas, esterilização de dispositivos médicos, esterilização de alimentos, 15 desinfecção das mãos do pessoal médico, hospitais, usuários domésticos e antibioterrorismo. A solução aquosa com ORP pode ser usada para a desinfecção de uma superfície, por exemplo, por contato da superfície com uma quantidade antiinfecciosa da solução aquosa com ORP. A superfície pode 20 ser colocada em contato com o uso de qualquer método adequado. Por exemplo, a superfície pode ser colocada em contato por irrigação da superfície com a solução aquosa com ORP, a fim de desinfetar a superfície.

Adicionalmente, a superfície pode ser colocada em 25 contato por aplicação da solução aquosa com ORP à superfície como um vapor ou um spray, ou por aerossolização, nebulização ou atomização, como aqui descrito, a fim de desinfetar a superfície. Além disso, a solução aquosa com ORP pode ser aplicada à superfície com 30 um lenço de limpeza, como aqui descrito. Por desinfecção de

uma superfície, a superfície pode ser limpa de microorganismos infecciosos. Alternativamente (ou adicionalmente), a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a presente invenção pode ser aplicada à superfície para fornecer uma barreira à infecção para, dessa forma, desinfetar a superfície.

A superfície(s) pode incluir uma ou mais superfícies biológicas, uma ou mais superfícies inanimadas, e combinações destas Superfícies biológicas podem incluir, por exemplo, tecidos em uma ou mais cavidades corpóreas como, por exemplo, a cavidade oral, a cavidade sinusal, a cavidade craniana, a cavidade abdominal, e a cavidade torácica. Tecidos dentro da cavidade oral incluem, por exemplo, tecido da boca, tecido da gengiva, tecido da língua e tecido da garganta. O tecido biológico também pode incluir tecido muscular, tecido ósseo, tecido de órgãos, tecido mucoso, tecido vascular, tecido neurológico, e combinações destes Superfícies inanimadas incluem, por exemplo, dispositivos implantáveis cirurgicamente, dispositivos prostéticos, e dispositivos médicos. De acordo com o método da presente invenção, as superfícies de órgãos internos, vísceras, músculo e semelhantes, que podem ser expostas durante cirurgias, podem ser desinfetadas, por exemplo, para manter a esterilidade do ambiente cirúrgico.

A solução aquosa com ORP também pode ser aplicada a seres humanos e/ou animais para o tratamento de várias condições, incluindo inflamação, associada com um ou mais dos seguintes: agente de limpeza de feridas abertas/cirúrgicas; desinfecção de patógeno cutâneo (por exemplo, para bactérias, micoplasmas, vírus, fungos,

príons); desinfecção de feridas de guerra; promoção da cicatrização de feridas; promoção da cicatrização de queimaduras; tratamento de úlceras gástricas; irrigação de feridas; fungos cutâneos; psoríase; pé de atleta; olho vermelho e outras infecções oculares; infecções do ouvido (por exemplo, ouvido do nadador); infecções pulmonares/nasais/sinusais; e outras aplicações médicas no corpo de um ser humano ou de um animal. O uso de soluções de água com ORP como promotor do crescimento celular tecidual é ainda descrito na Publicação do Pedido de Patente U.S. 2002/0160053 (aqui incorporado por referência).

Organismos que podem ser controlados, reduzidos, mortos ou erradicados por tratamento com a solução aquosa com ORP usada de acordo com a invenção incluem, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter baumannii*, espécies de *Acinetobacter*, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE, MDR), *Escherichia coli* resistente à vancomicina, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, e outras bactérias suscetíveis, além de leveduras, por exemplo, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A solução aquosa com

ORP também pode ser usada de acordo com a invenção para controlar, reduzir, matar ou erradicar vírus incluindo, por exemplo, adenovírus, vírus da imunodeficiência humana (HIV), rinovírus, influenza (por exemplo, influenza A), 5 hepatite (por exemplo, hepatite A), coronavírus (responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS)), rotavírus, vírus respiratório sincicial, vírus do herpes simples, vírus varicela zoster, vírus da rubéola e outros vírus suscetíveis.

10 A solução aquosa com ORP usada de acordo com a invenção também pode ser usada no controle da atividade de alérgenos presentes no ambiente. Nesse contexto, alérgenos tipicamente incluem qualquer substância com exceção de bactérias, fungos, leveduras ou vírus que podem ativar uma 15 resposta imune adversa, ou alergia, em pessoas ou animais suscetíveis. Asma é uma resposta fisiológica comum após exposição a um ou mais de tais alérgenos. Alérgenos podem ser viáveis (ou seja, de organismos vivos ou mortos) ou não viáveis (por exemplo, não vivos como tecidos), e podem 20 estar presentes no ambiente, por exemplo, em residências e/ou ambientes de trabalho.

Alérgenos domésticos com base em proteína que podem ser tratados com a solução aquosa com ORP pode incluir, por exemplo, pelos, pele, e fezes de animais, poeira doméstica, 25 ervas, gramas, árvores, carapatos, e polens. Alérgenos animais podem incluir, por exemplo, epitélio do gato, epitélio do cão, caspa de cavalo, caspa de vaca, caspa de cão, epitélio de porquinho-da-índia, plumas de ganso, epitélio de camundongo, urina de camundongo, epitélio de 30 rato e urina de rato.

Alérgenos ocupacionais podem incluir, por exemplo, agentes de alto peso molecular, como proteínas naturais geralmente derivadas de proteínas de planta ou animais, e substâncias químicas de baixo peso molecular, como diisocianatos, e outro material encontrado em alguns tecidos. Outros alérgenos químicos que podem estar presentes no ambiente de trabalho podem incluir, por exemplo, anidridos, antibióticos, poeira de madeira e corantes. Numerosas proteínas podem ser alérgenos ocupacionais incluindo gomas vegetais, enzimas, proteínas animais, insetos, proteínas de planta, e legumes.

Alérgenos adicionais que podem ser tratados pela solução aquosa com ORP são descritos em Korenblat e Wedner, "Allergy Theory and Practice" (1992) e Middleton, Jr., "Allergy Principles and Practice" (1993).

A solução aquosa com ORP pode ser aplicada para desinfetar e esterilizar de qualquer modo adequado. Por exemplo, para desinfetar e esterilizar equipamento médico ou dentário, o equipamento pode ser mantido em contato com a solução aquosa com ORP por um período de tempo suficiente para reduzir o nível de organismos presentes no equipamento até um nível desejado.

Para desinfecção e esterilização de superfícies duras, a solução aquosa com ORP pode ser aplicada à superfície dura diretamente de um recipiente no qual a solução aquosa com ORP é armazenada. Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser derramada, pulverizada ou de algum outro modo aplicada diretamente à superfície dura. A solução aquosa com ORP pode então ser distribuída sobre a superfície dura com o uso de um substrato adequado como, por exemplo, pano,

tecido ou toalha de papel. Em aplicações hospitalares, o substrato é preferivelmente estéril. Alternativamente, a solução aquosa com ORP pode primeiro ser aplicada a um substrato como, por exemplo, pano, tecido ou toalha de 5 papel. O substrato umedecido pode então ser colocado em contato com a superfície dura. Alternativamente, a solução aquosa com ORP pode ser aplicada às superfícies duras por dispersão da solução no ar, como aqui descrito. A solução aquosa com ORP pode ser aplicada de forma similar a seres 10 humanos e animais.

A solução aquosa com ORP também pode ser aplicada com um lenço de limpeza que compreende um substrato não hidrossolúvel e a solução aquosa com ORP, como aqui descrita, em que a solução aquosa com ORP é distribuída 15 sobre o substrato. A solução aquosa com ORP pode ser impregnada, revestida, coberta ou de algum outro modo aplicada ao substrato. Preferivelmente, o substrato é pré-tratado com a solução aquosa com ORP, antes da distribuição dos lenços de limpeza aos usuários finais.

20 O substrato para o lenço de limpeza pode ser qualquer material absorvente não hidrossolúvel ou adsorvente adequado. Uma ampla variedade de materiais pode ser usada como substrato. Ele deve ter resistência à umidade, abrasividade, maciez e porosidade suficientes. Além disso, 25 o substrato não deve afetar de forma adversa a estabilidade da solução aquosa com ORP. Exemplos incluem substratos não entrelaçados, substratos entrelaçados, substratos hidro-entrelaçados e esponjas.

O substrato pode ter uma ou mais camadas. Cada camada 30 pode ter texturas e abrasividade iguais ou diferentes.

Texturas diferentes podem causadas pelo uso de diferentes combinações de materiais ou pelo uso de diferentes processos de manufatura ou uma combinação destes. O substrato não deve se dissolver ou se degradar na água. O 5 substrato pode, desse modo, fornecer um veículo para a liberação da solução aquosa com ORP à superfície a ser tratada.

O substrato pode ser uma única folha não entrelaçada ou múltiplas folhas não entrelaçadas. A folha não 10 entrelaçada pode ser feita de polpa de madeira, fibras sintéticas, fibras naturais, e misturas destas. Fibras sintéticas adequadas para uso no substrato podem incluir, sem limitação, poliéster, viscose, náilon, polipropileno, polietileno, outros polímeros de celulose, e misturas 15 destas fibras. Os não entrelaçados podem incluir materiais não entrelaçados fibrosos de folha que incluem fundidos a sopro, co-formados, air-laid, ligados por fiação, colocados a úmido, materiais de trama *bonded-carded*, hidro-entrelaçados (também conhecida como *spunlaced*) materiais, e 20 combinações destes. Esses materiais podem compreender fibras sintéticas ou naturais, ou combinações destas. Um ligante pode opcionalmente estar presente no substrato.

Exemplos de substratos não entrelaçados e não 25 hidrossolúveis adequados incluem celulose 100% Wadding de Grau 1804 de Little Rapids Corporation, material de polipropileno 100% perfurado NB 701-2.8-W/R de American Non-wovens Corporation, uma mistura de fibras celulósicas e sintéticas Hydraspun 8579 de Ahlstrom Fibre Composites e Viscose 70%/PES 30% Código 9881 de PGI Nonwovens Polymer 30 Corp. Exemplos adicionais de substratos não entrelaçados

adequados para uso nos lenços de limpeza são descritos nas Patentes U.S. N°s 4.781.974, 4.615.937, 4.666.621 e 5.908.707 e nas Publicações de Pedido de Patente Internacional WO 98/03713, WO 97/40814, e WO 96/14835 (que 5 são aqui incorporadas por referência).

O substrato também pode ser feito de materiais entrelaçados, tais como fibras de algodão, misturas de algodão/náilon ou outros têxteis. Celulose regenerada, espumas de poliuretano, e semelhantes, que são usadas na 10 produção de esponjas, também são adequadas para uso.

A capacidade de carga líquida do substrato deve ser de pelo menos cerca de 50%-1.000% do peso seco deste, principalmente pelo menos cerca de 200%-800%. Isso é expresso como carga de 1/2 a 10 vezes o peso do substrato. 15 O peso do substrato varia sem limitação de cerca de 0,01 a cerca de 1.000 gramas por metro quadrado, principalmente 25 a 120 gramas/m<sup>2</sup> (denominado "peso-base"), e tipicamente é produzido como uma folha ou trama que é cortada, cortada sob pressão, ou de algum outro modo dimensionada no formato 20 e tamanho apropriados. Os lenços de limpeza terão preferivelmente certa resistência tênsil úmida que é, sem limitação, de cerca de 25 a cerca de 250 Newtons/m, mais preferivelmente, de cerca de 75-170 Newtons/m.

A solução aquosa com ORP pode ser distribuída, 25 impregnada, revestida, coberta ou de algum outro modo aplicada ao substrato por qualquer método adequado. Por exemplo, porções individuais de substrato podem ser tratadas com uma quantidade distinta da solução aquosa com ORP. Preferivelmente, um tratamento de massa de uma trama 30 contínua de material de substrato com a solução aquosa com

ORP é realizado. Toda a trama de material de substrato pode ser embebida na solução aquosa com ORP. Alternativamente, à medida que a trama de substrato é rebobinada, ou até mesmo durante a criação de um substrato não entrelaçado, a 5 solução aquosa com ORP pode ser pulverizada ou metrificada sobre a trama. Uma pilha de porções de substrato cortadas e dimensionadas individualmente pode ser impregnada ou revestida com a solução aquosa com ORP em seu recipiente pelo fabricante.

10 Os lenços de limpeza opcionalmente podem conter componentes adicionais para aprimorar as propriedades dos lenços. Por exemplo, os lenços de limpeza podem ainda compreender polímeros, tensoativos, polissacarídeos, policarboxilatos, alcoóis polivinílicos, solventes, agentes 15 quelantes, tampões, espessantes, pigmentos, corantes, fragrâncias, e misturas destes para aprimorar as propriedades dos lenços. Esses componentes opcionais não devem afetar de forma adversa a estabilidade da solução aquosa com ORP. Exemplos de vários componentes que podem 20 opcionalmente ser incluídos nos lenços de limpeza são descritos nas Patentes U.S. 6.340.663, 6.649.584 e 6.624.135 (que são aqui incorporadas por referência).

Os lenços de limpeza podem ser lacrados individualmente com uma capa termoplástica lacrada com 25 calor ou com cola (por exemplo, polietileno, Mylar, e semelhantes). Os lenços também podem ser embalados como várias folhas individuais para uma distribuição mais econômica. Os lenços de limpeza podem ser preparados colocando-se inicialmente várias folhas do substrato em um 30 dispensador, e a seguir colocando-se em contato as folhas

de substrato com a solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção. Alternativamente, os lenços de limpeza podem ser formados como uma trama contínua aplicando-se a solução aquosa com ORP ao substrato durante 5 o processo de manufatura, e depois colocando-se o substrato umedecido em um dispensador.

O dispensador inclui, sem limitação, uma lata com um fechamento ou um tubo com fechamento. O fechamento no dispensador pode ser empregado para selar os lenços úmidos 10 do ambiente externo e para prevenir volatilização prematura dos ingredientes líquidos.

O dispensador pode ser feito de qualquer material adequado que seja compatível tanto com o substrato quanto com a solução aquosa com ORP. Por exemplo, o dispensador 15 pode ser feito de plástico como, por exemplo, polietileno de alta densidade, polipropileno, policarbonato, polietileno tereftalato (PET), cloreto de polivinila (PVC), ou outros plásticos rígidos.

A trama contínua de lenços pode ser passada através de 20 uma abertura fina no topo do dispensador, principalmente, através do fechamento. Pode então ser necessário um meio para dimensionar o comprimento ou o tamanho desejado do lenço da trama. Pode ser fornecida uma lâmina cortante, uma borda serrilhada ou outro meio de corte da trama no tamanho 25 desejado no topo do dispensador, para exemplo não limitante, com a abertura fina na verdade se desdobrando em uso como uma borda cortante. Alternativamente, a trama contínua de lenços pode ser marcada, dobrada, segmentada, perfurada ou parcialmente cortadas em tamanhos ou 30 comprimentos uniformes ou não uniformes, o que então

evitaria a necessidade de uma borda cortante afiada. Além disso, os lenços podem ser interfoliados, a fim de que a remoção de um lenço avance o lenço seguinte.

A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção alternativamente pode ser dispersa no ambiente através de um meio gasoso como, por exemplo, ar. A solução aquosa com ORP pode ser dispersa no ar por qualquer meio adequado. Por exemplo, a solução aquosa com ORP pode ser formada em gotículas de qualquer tamanho adequado e dispersa em uma sala.

Para aplicações em pequena escala, a solução aquosa com ORP pode ser dispensada por meio de um atomizador que inclui uma coluna e bomba. Alternativamente, a solução aquosa com ORP pode ser embalada em recipientes de aerossol. Os recipientes de aerossol podem incluir o produto a ser dispensado, um propelente, um recipiente e uma válvula. A válvula pode incluir um ativador e um tubo de imersão. O conteúdo do recipiente pode ser dispensado pressionando-se o ativador. Os vários componentes do recipiente de aerossol devem ser compatíveis com a solução aquosa com ORP. Propelentes adequados podem incluir um halocarbono liquefeito, hidrocarboneto, ou mistura halocarbono-hidrocarboneto, ou um gás comprimido como, por exemplo, dióxido de carbono, nitrogênio ou óxido nitroso. Sistemas em aerossol preferivelmente geral gotículas que possuem um tamanho que varia de cerca de 0,15 µm a cerca de 5 µm.

Para algumas aplicações, a solução aquosa com ORP pode opcionalmente conter um agente alvejante. O agente alvejante pode incluir, por exemplo, qualquer composto

adequado que clareie ou embranqueça um substrato. A solução aquosa com ORP que contém um agente alvejante pode ser usada na lavagem de roupa doméstica para desinfetar e esterilizar bactérias e germes, além de clarear roupas.

5 Agentes alvejantes adequados incluem, sem limitação, agentes alvejantes que contêm cloro e, opcionalmente, agentes alvejantes que contêm peróxido. Também podem ser adicionadas misturas de agentes alvejantes à solução aquosa com ORP. Preferivelmente, o agente alvejante é adicionado  
10 na forma de uma solução aquosa à solução aquosa com ORP.

Agentes alvejantes que contêm cloro adequados podem incluir, por exemplo, cloro, hipocloritos, compostos de N-cloro e, opcionalmente, dióxido de cloro. Preferivelmente, o agente alvejante que contém cloro adicionado à solução aquosa com ORP é hipoclorito de sódio ou ácido hipocloroso.  
15 Outros agentes alvejantes que contêm cloro adequados incluem, por exemplo, cloro, hipoclorito de cálcio, solução alvejante (por exemplo, solução aquosa de hipoclorito de cálcio e cloreto de cálcio), pó alvejante (por exemplo,  
20 mistura de hipoclorito de cálcio, hidróxido de cálcio, cloreto de cálcio, e hidratos destes), hipoclorito dibásico de magnésio, hipoclorito de lítio, fosfato trissódico clorado, e misturas destes.

A adição de um agente alvejante à solução aquosa com  
25 ORP pode ser feita de qualquer modo adequado. Preferivelmente, inicialmente é preparada uma solução aquosa que contém o agente alvejante. Uma solução aquosa que contém o agente alvejante pode ser preparada com o uso de alvejante doméstico (por exemplo, alvejante Clorox®) ou  
30 outra fonte adequada de agente alvejante que contém cloro

ou outro agente alvejante. O solução do agente alvejante pode então ser combinada com a solução aquosa com ORP.

O agente alvejante pode ser adicionado à solução aquosa com ORP em qualquer quantidade adequada.

5 Preferivelmente, a solução aquosa com ORP que contém um agente alvejante não é irritante para a pele humana ou animal. Preferivelmente, o teor total de íons cloreto da solução aquosa com ORP que contém um agente alvejante que contém cloro é de cerca de 1.000 ppm a cerca de 5.000 ppm  
10 e, preferivelmente, de cerca de 1.000 ppm a cerca de 3.000 ppm. O pH da solução aquosa com ORP que contém um agente alvejante que contém cloro é preferivelmente de cerca de 8 a cerca de 10, e o potencial de oxirredução é preferivelmente de cerca de +700 mV a cerca de +800 mV.

15 Os exemplos a seguir ilustram ainda mais a invenção, mas, evidentemente, não devem ser considerados de forma alguma como limitantes de seu escopo.

#### EXEMPLOS 1-3

20 Esses exemplos demonstram as características únicas da solução aquosa com ORP usada de acordo com a invenção. As amostras da solução aquosa com ORP nos Exemplos 1-3 foram analisadas de acordo com os métodos aqui descritos para determinar as propriedades físicas e os níveis de espécies iônicas e de outras espécies químicas presentes em cada 25 amostra. Os resultados obtidos para dióxido de cloro, ozônio e peróxido de hidrogênio se baseiam em testes-padrão usados para medir estas espécies, mas podem ser indicativos de espécies diferentes, o que também pode gerar resultados positivos do teste. Além disso, foi relatado que dióxido de 30 cloro, ozônio e peróxido de hidrogênio reagem com

hipoclorito, resultando no seu consumo e na produção de outros compostos (por exemplo, HCl e O<sub>2</sub>). O pH, o potencial de oxirredução (ORP) e as espécies iônicas presentes são apresentados na Tabela 1 para cada amostra da solução aquosa com ORP.

**Tabela 1: Características físicas e espécies iônicas presentes para as amostras de solução aquosa com ORP**

	EXEMPLO 1	EXEMPLO 2	EXEMPLO 3
pH	7,45	7,44	7,45
ORP (mV)	+879	+881	+874
Cl <sup>-</sup> total (ppm)	110	110	120
Cl <sup>-</sup> ligado (ppm)	5	6	6

A solução aquosa com ORP tem características físicas adequadas para uso, por exemplo, na desinfecção, esterilização, limpeza e/ou na prevenção e/ou no tratamento de inflamação, sinusite, peritonite ou infecção.

#### EXEMPLOS 4-10

Esses exemplos demonstram a adição de um agente alvejante à solução aquosa com ORP de acordo com a invenção em várias quantidades. Em particular, esses exemplos demonstram a atividade antimicrobiana e capacidade de branqueamento de tecidos das composições.

Uma solução alvejante 10% Clorox® foi preparada com o uso de água destilada. As soluções seguintes foram então preparadas com a utilização da solução alvejante 10%: solução aquosa com ORP 80%/alvejante 20% (Exemplo 4); solução aquosa com ORP 60%/alvejante 40% (Exemplo 5); solução aquosa com ORP 40%/alvejante 60% (Exemplo 6); solução aquosa com ORP 20%/alvejante 80% (Exemplo 7); e solução aquosa com ORP 0%/alvejante 100% (Exemplo 8).

Também foram usadas soluções de controle para comparação, incluindo solução aquosa com ORP 100%/alvejante 0% (Exemplo 9) e uma solução aquosa com ORP com detergente Tween 20 0,01% (Exemplo 10). As características físicas dessas amostras foram determinadas, especificamente pH, potencial de oxirredução (ORP), cloro total ( $\text{Cl}^-$ ) teor, e ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) teor, e foram testadas quanto ao teor de dióxido de cloro e teor de peróxido, cujos resultados são apresentados na Tabela 2.

10 **Tabela 2: Características físicas das composições de solução aquosa com ORP/alvejante**

	pH	ORP	$\text{Cl}^-$ Total (ppm)	$\text{HClO}^-$ (ppm)
Ex. 4	8,92	+789	1.248	62
Ex. 5	9,20	+782	2.610	104
Ex. 6	9,69	+743	4.006	80
Ex. 7	9,86	+730	4.800	48
Ex. 8	9,80	+737	5.000	50
Ex. 9	7,06	+901	64	32
Ex. 10	6,86	+914	51	26

O grande bolo de íons cloro adicionado como parte do agente alvejante impediu a medida precisa dos níveis de dióxido de cloro e peróxido, como indicado pelas 15 designações n.d. Além disso, os resultados obtidos para dióxido de cloro e peróxido se baseiam em testes-padrão usados para medir estas espécies, mas podem ser indicativos de espécies diferentes, o que também pode gerar resultados positivos do teste. Além disso, foi relatado que dióxido de 20 cloro, ozônio e peróxido de hidrogênio reagem com hipoclorito, resultando no seu consumo e na produção de outros compostos (por exemplo,  $\text{HCl}$  e  $\text{O}_2$ ). Como esses

exemplos demonstram, os níveis de ácido hipocloroso da solução aquosa com ORP, com e sem a adição de um agente alvejante, são similares.

As amostras dos Exemplos 4-10 foram submetidas a um teste de contagem de esporos superiores com a utilização de esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* (ATCC N°: 9.372 obtido de "SPS Medical of Rush", Nova York). As suspensões de esporos foram concentradas (por evaporação em uma coifa estéril) até  $4 \times 10^6$  esporos por 100 microlitros. Uma amostra de 100 microlitros da suspensão de esporos foi misturada com 900 microlitros de cada uma das amostras nos Exemplos 4-10. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por períodos de 1 a 5 minutos, como mostrado na Tabela 3. Nos momentos indicados, 100 microlitros das amostras incubadas foram plaqueados em placas de TSA individuais e incubados por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , e após esse tempo o número de colônias resultantes em cada placa foi determinado. As placas de controle demonstraram que as concentrações de esporos de partida eram  $> 1 \times 10^6$  esporos/100 microlitros. A concentração de esporos de *Bacillus* para as várias amostras nos vários períodos de incubação (como a média de duas determinações) é apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3: Concentrações de esporos de *Bacillus***

	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos
Ex. 4	» 1.000	411	1	0	2
Ex. 5	» 1.000	1.000	1	0	0
Ex. 6	» 1.000	» 1.000	> 1.000	22	0
Ex. 7	» 1.000	» 1.000	> 1.000	15	0
Ex. 8	» 1.000	» 1.000	> 1.000	3	1

Ex. 9	» 1.000	74	0	0	0
Ex 10	» 1.000	239	3	0	0

Como esses resultados demonstram, à medida que a concentração de alvejante (como solução alvejante aquosa 10%) aumenta, a quantidade de esporos de *Bacillus morta* é reduzida para as amostras incubadas por 2-3 minutos. No entanto, para amostras incubadas por 5 minutos, a concentração de alvejante não interfere com a morte de esporos de *Bacillus*. Além disso, os resultados demonstram que a adição de detergente 0,01% à solução aquosa com ORP não reduz a morte de esporos.

As amostras dos Exemplos 4-10 foram submetidas a um teste de branqueamento de tecidos. O tecido sobre os quais as amostras foram testadas eram camisetas de crianças com 100% de viscose com manchas de corante azul escuro. Pedaços de 12,903 centímetros quadrados de tecido tingido foram colocados em tubos plásticos de 50 ml. Cada pedaço de tecido foi coberto por uma amostra da solução nos Exemplos 4-10. O tempo decorrido até o branqueamento completo ser obtido, como determinado pelo branqueamento do tecido, é apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4: Tempo até o branqueamento completo da amostra de tecido**

Exemplo	Tempo
Ex. 4	39 minutos
Ex. 5	23 minutos
Ex. 6	18 minutos
Ex. 7	19 minutos
Ex. 8	10 minutos
Ex. 9	> 6 horas

Ex. 10	> 6 horas
--------	-----------

Como demonstrado por esses exemplos, à medida que a concentração da solução aquosa com ORP aumenta na composição, o tempo até o branqueamento completo ser obtido aumenta.

5    EXEMPLO 11

A finalidade desse estudo foi avaliar a segurança do teste de uma solução aquosa com ORP exemplar, Microcyn, quando administrada como gotas na cavidade nasal de coelhos. Trinta e três coelhos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, Grupos I e II. O Grupo I (18 animais) serviu como o grupo de controle, e o Grupo II (15 animais) foi dosado com o artigo de teste. No 1º Dia ou no Dia, os pesos corporais foram registrados e amostras de sangue foram coletadas para análise de parâmetros selecionados. No Dia 0, 500 µl de soro fisiológico estéril foram administrados aos animais do Grupo I, e 500 µl do artigo de teste (em uma concentração de 50%) foram administrados aos animais do Grupo II. Tanto o artigo de controle quanto o artigo de teste foram administrados duas vezes diariamente como gotas na narina direita. Os animais foram dosados da mesma forma nos 1º-6º Dias. Os animais foram observados diariamente quanto aos sinais de efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos, com atenção especial ao nariz. Os pesos corporais foram registrados semanalmente até o término do estudo. No 7º Dia, um terço dos animais de cada grupo foram selecionados para coleta de sangue, sacrifício e necropsia. Os animais restantes continuaram a ser dosados até o 14º Dia, quando metade dos animais de cada grupo sói selecionada para coleta de sangue,

sacrifício e necropsia. No 21º Dia, após um período de recuperação de 7 dias, os animais restantes tiveram o sangue coletado, e foram sacrificados e submetidos à necropsia. Amostras da mucosa nasal de ambas as narinas 5 foram coletadas de cada animal para análise histopatológica.

A necropsia consistiu em observações macroscópicas do trato respiratório. Toda a passagem nasal e os ossos associados foram coletados e fixados em formalina 10 tamponada. Amostras de quaisquer anormalidades visíveis no trato respiratório também foram coletadas para histopatologia. Três amostras de biópsia (cavidade nasal anterior, média e posterior) por narina (direita tratada e esquerda não tratada) foram examinadas. A histopatologia 15 microscópica da mucosa nasal incluiu: integridade do epitélio, presença ou ausência de cílios epiteliais, infiltração de células inflamatórias, edema, presença de células caliciformes, hiperplasia de glândulas, alterações no número ou nas características de vasos sanguíneos e 20 quaisquer outras alterações ou observações.

Os resultados (observações em vida, incluindo observações nasais, pesos corporais, análise sanguínea, resultados da necropsia macroscópica e da histopatologia) do grupo de teste foram comparados com o grupo de controle. 25 O grupo de teste não era significativamente diferente dos animais tratados com soro fisiológico em termos de irritação leve.

#### EXEMPLO 12

Esse exemplo ilustra um estudo clínico que pode ser 30 usado para determinar a eficácia de uma solução aquosa com

ORP exemplar para o tratamento de faringeite.

Um tal solução aquosa com ORP para uso nesse estudo é conhecida como "Microcyn 60", recentemente introduzida no mercado mexicano como um anti-séptico. Microcyn 60 é uma solução superoxidada de pH neutro com atividade germicida, esterilizante e anti-séptica de ferimentos de acordo com certificações obtidas da "Secretariat of Health of Mexico". Microcyn 60 é preparada a partir de água pura e sal (NaCl), tem uma pequena concentração de sódio (<55 ppm) e cloro (<80 ppm), um pH na faixa de 7,2 a 7,8, e potencial de oxirredução na faixa de 840 mV a 960 mV. Microcyn 60 é produzido em uma concentração apenas, e não precisa ser ativado ou diluído.

Essa solução é produzida a partir de água obtida por osmose reversa, que é então submetida a um gradiente eletroquímico gerado por alta voltagem e cloreto de sódio. Desse modo, as espécies reativas que se formam nas múltiplas câmaras em que o gradiente eletroquímico é gerado são selecionadas em uma maneira controlada para criar Microcyn 60. O resultado é uma solução com um teor controlado de radicais livres que conferem um alto potencial de oxirredução (+840 mV a +960 mV) e consequentemente alta atividade antimicrobiana.

Acredita-se que ácido hipocloroso e hipoclorito de sódio estão entre os elementos mais abundantes contidos em Microcyn 60, com outros em menores concentrações como, por exemplo, íons cloreto entre outros. Embora os requerentes não desejem estar atados por uma teoria particular, acredita-se que o efeito desinfetante não dependa necessariamente e exclusivamente da quantidade de cloro,

mas também pode depender das espécies reativas de oxigênio e/ou oxigênio ou um ou mais precursores destes. Além disso, e em contraste a outras soluções superoxidadas que foram relatadas na literatura, Microcyn 60 tem um pH neutro (6,4-5 7,8), não é corrosiva e é estável em estocagem por até 2 anos. Todas essas características tornaram possível produzir uma solução superoxidada que eficaz como um desinfetante de nível elevado e compatível para uso tanto em superfícies inanimadas quanto em superfícies biológicas 10 (por exemplo, tecidos).

Testes de estabilidade acelerada demonstraram que Microcyn 60 pode ser estocado em condições de temperatura com ampla variação, de 4 a 65°C, sem perder sua atividade desinfetante por um período de 2 anos. Microcyn 60 pode ser 15 estocado e distribuído mesmo sob condições relativamente adversas sem perder sua atividade antimicrobiana. Ao contrário, devido à ausência de estabilidade, tiveram que ser produzidas soluções convencionais por equipamento especializado e dispendioso próximo ou no ponto de uso, por 20 exemplo, o hospital, para usar as soluções para o objetivo pretendido.

Pelo fato de Microcyn 60 ser produzido em penas uma concentração, a dose de Microcyn 60 pode ser modificada apenas por mudanças no volume aplicado por área da pele. 25 Nos estudos toxicológicos, as doses de Microcyn 60 aplicadas topicalmente à pele intacta variaram de cerca de 0,05 a cerca de 0,07 ml/cm<sup>2</sup>; no estudo de toxicidade dermatológica aguda e na investigação de irritação cutânea, Microcyn 60 pode ser aplicado em doses de até 8,0 ml/cm<sup>2</sup>, e 30 naqueles que investigaram sua aplicação em feridas

profundas aplicaram Microcyn 60 em uma dose de cerca de 0,09 ml/cm<sup>2</sup>.

Foram realizados estudos toxicológicos em que Microcyn 60 foi aplicado topicalmente à pele intacta, com o uso de 5 uma única aplicação com exposição de 4 a 24 h. Múltiplas aplicações de Microcyn 60, uma ou duas vezes ao dia, durante um período de 7 dias foram avaliadas para feridas profundas em ratos.

Dois estudos foram realizados na pele intacta de 10 coelhos para avaliar o efeito de Microcyn 60 para irritação aguda e toxicidade dérmica. Nenhum sinal clínico, irritação dérmica, ou anormalidades na pele na autópsia foram encontrados em qualquer um dos animais expostos ao Microcyn 60.

15 A caracterização da toxicidade local e sistêmica de Microcyn 60 aplicada topicalmente em uma ferida profunda foi avaliada em ratos. Não foram observadas anormalidades ou diferenças significativas nos parâmetros da bioquímica do sangue ou na citologia hematológica, nem anormalidades nas 20 autópsias. As graduações da irritação cutânea e a histopatologia das feridas e dos tecidos em torno do local de aplicação não revelaram qualquer diferença entre as feridas tratadas com Microcyn 60 e aquelas do grupo de controle tratado com soro fisiológico.

25 A toxicidade sistêmica de Microcyn 60 também foi avaliada por meio de uma injeção intraperitoneal em camundongos. Para isso, cinco camundongos foram injetados com uma dose única (50 ml/kg) de Microcyn 60 pela via intraperitoneal. Da mesma forma, cinco camundongos de 30 controle foram injetados com uma dose única (50 ml/kg) de

soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,9%). Nessa investigação, não foram observadas mortalidade nem qualquer evidência de toxicidade sistêmica em qualquer um dos animais que receberam a dose intraperitoneal única de 5 Microcyn 60, indicando que a LD<sub>50</sub> é acima 50 ml/kg.

Microcyn 60 foi administrada pela via oral em ratos para permitir sua absorção e para caracterizar qualquer efeito tóxico inerente ao produto. Nesse estudo, uma dose única (4,98 ml/kg) foi administrada por um tubo esofágico a 10 três ratos albinos da cepa Sprague-Dawley. Não houve mortalidade, nem havia sinais clínicos ou anormalidades nas autópsias de qualquer um dos animais expostos à dose oral única de Microcyn 60.

O potencial de Microcyn 60 aplicada topicalmente para 15 irritação ocular também foi avaliado em coelhos. Não foi observada irritação ocular ou qualquer outro sinal clínico em qualquer animal exposto à Microcyn 60 por administração tópica por meio da via ocular.

Microcyn 60 foi aplicada pela via inalatória em ratos 20 para determinar a toxicidade aguda potencial por inalação. Todos os animais mostraram uma redução muito discreta ou discreta da atividade e piloereção após a exposição, mas todos estavam assintomáticos no dia seguinte. Não foi observada mortalidade ou anormalidades na autópsia dos 25 animais expostos à Microcyn 60 por inalação.

A avaliação do potencial para sensibilização da pele com Microcyn 60 foi realizada em porquinhos-da-índia usando um a método de oclusão com curativo modificado (Buehler). Não foi observada irritação nos animais do grupo de 30 controle após um ataque de tratamento simples, nem nos

animais avaliados (tratados por indução) após ataque com o tratamento. Esses estudos demonstram que Microcyn 60 não provoca uma reação de sensibilização.

Dessa forma, quando foi aplicada à pele intacta, a 5 feridas dérmicas abertas profundas, no saco conjuntival, por vias oral e de inalação ou por meio de injeção intraperitoneal, Microcyn 60 não mostrou efeitos adversos relacionados ao produto. Também há experiência no tratamento de mais de milhares de pacientes com feridas de 10 natureza muito diversa na pele e nas mucosas, com excelentes resultados anti-sépticos e cosméticos. Conseqüentemente, Microcyn 60 aplicada topicalmente deve ser eficaz e bem tolerada nesse experimento clínico.

Microcyn 60 é embalada em garrafas PET transparentes 15 lacradas de 240 ml. Esse produto é estocado em temperatura ambiente e permanece estável por até 2 anos nestas garrafas. A partir de seu perfil de alta segurança biológica, Microcyn 60 pode ser descartada com segurança, por exemplo, por esvaziamento na pia, sem risco de 20 contaminação ou corrosão.

Foram feitos vários experimentos microbianos com Microcyn 60, tanto nos Estados Unidos quanto no México. A erradicação de mais de 90% das bactérias ocorre nos primeiros segundos de exposição. A atividade antibacteriana 25 e antimicótica que Microcyn 60 exibe de acordo com esse padrão é resumida na Tabela 5.

**Tabela 5. Tempos de morte.**

Bactéria	Catálogo	Tempo de ação (redução abaixo de 99,999%)

<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC 25.619	1 min
<i>St. aureus</i>	ATCC 6.538	1 min
<i>E. coli</i>	ATCC 11.229	1 min
<i>S. typhi</i>	CDC 99	1 min
<i>C. albicans</i>	ATCC	1 min
<i>B. subtilis</i>	9.372	
Esporos baixos ( $10^4$ )		10 min
Esporos altos ( $10^6$ )		15 min

O experimento de atividade esporicida foi realizado de acordo com o protocolo da OPAS [Organização Pan-Americana de Saúde]/OMS (Organização Mundial de Saúde).

A atividade viricida de Microcyn 60 foi recentemente confirmada em estudos realizados nos Estados Unidos contra HIV, e sua atividade contra *Listeria monocytogenes*, MRSA e *Mycobacterium tuberculosis* também foi demonstrada. Dessa forma, foi demonstrado que Microcyn 60, quando administrada como recomendado, pode erradicar bactérias, fungos, vírus e esporos com um a quinze minutos de exposição.

Nesse estudo, são recrutados 40 pacientes com faringite/amidalite aguda causada por *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A e que não receberam tratamento. Os critérios de inclusão são os seguintes: idade de 12 a 40 anos e dois ou mais dos seguintes sintomas: queimação orofaríngea; dor à deglutição; eritema faríngeo ou das amídalas (com ou sem exsudato); linfadenopatia cervical; e imunoensaio positivo para antígeno do *Streptococcus* do grupo A Teste (StrepA - Abbott Labs). Os critérios de exclusão são os seguintes: febre > 38°C; broncospasmo (excluído pela clínica); tosse grave; sinusite-rinite (excluída pela clínica); refluxo esofágico (excluído pela

clínica); uso de antibióticos nas duas semanas anteriores ao estudo; pacientes que participaram de outro estudo clínico nas últimas 8 semanas; febre reumática; glomerulonefrite pós-estreptocócica; cardiopatia crônica 5 grave; insuficiências renal, hepática ou pulmonar graves; e gravidez ou lactação.

No começo desse estudo, os pacientes podem usar medicamentos concomitantes como antipiréticos e analgésicos, incluindo paracetamol e acetilsalicílicos, mas 10 não podem utilizar antiinflamatórios como as ibuprofeno, Mesulid, inibidores da COX-2 ou esteróides. Deve ser obtida uma autorização informada por escrito, antes do paciente se submeter a qualquer procedimento específico do estudo.

Os pacientes são avaliados em três visitas. Na 15 primeira visita, o paciente apresenta clinicamente faringite/amidalite aguda, e é colhida a história clínica e é feito um exame médico, é realizado um imunoensaio rápido para *Streptococcus* e coletado um exsudato faríngeo. Após ser declarado elegível e após ter assinado o termo de 20 autorização informada, o paciente recebe a prescrição de duas lavagens faríngeas de 30 segundos e 5 ml de Microcyn 60 cada. Esses enxágües são feitos a cada 3 horas, por um total de quatro vezes ao dia por 3 dias.

A segunda visita é feita 72 horas após ter sido 25 tratado com Microcyn 60. Na segunda visita, a evolução clínica e os efeitos colaterais de Microcyn 60 são avaliados. É coletado um novo exsudato faríngeo, e será decidido, de acordo com a evolução clínica, se a continuação do tratamento será com antibióticos ou com um 30 paliativo. Uma terceira visita é feita após 10 dias para

alta do paciente.

Para ser elegível e clinicamente avaliado nesse estudo, cada paciente deve apresentar *Streptococcus* β-hemolítico A confirmado por cultura. Todos os pacientes 5 devem fazer 18 enxágües de 30 segundos e 5 ml de Microcyn 60 cada, ou um máximo de 24 enxágües no espaço de 72 horas.

O parâmetro primário de eficácia é uma redução de 3 ordens de magnitude da carga bacteriana da cultura inicial, comparada com a cultura coletada após a administração de 10 Microcyn 60. A avaliação bacteriológica é realizada 72 horas após tratamento com Microcyn 60. Os parâmetros secundários de eficácia são a melhora relatada clinicamente, com ênfase específica na redução de dor faríngea e disfagia. Os sintomas clínicos são registrados 15 nas visitas 1, 2 e 3.

A tolerância é avaliada por registros de eventos adversos. Um evento adverso é definido como qualquer declaração sintomática do paciente que se submete ao tratamento com Microcyn 60, relacionado ou não ao anti-20 séptico, que apareça no curso do tratamento.

Os resultados da eficácia bacteriológica (o principal critério de eficácia) são emitidos por um bacteriologista, independentemente dos sintomas clínicos. Os testes para o antígeno de *Streptococcus* do grupo A e para a cultura 25 inicial do exsudato faríngeo são feitos na visita (Visita 1), de acordo com o Esquema de Avaliações, e antes da administração de Microcyn 60. A segunda coleta e cultura de exsudato são feitas 72 horas após a administração de Microcyn 60 (Visita 2). É feito um antibiograma em todas as 30 culturas para determinar a resistência bacteriana à

penicilina, eritromicina, claritromicina e lincomicina por meio de um teste-padrão de disco de difusão. A eficácia bacteriológica é definida como a redução por três ordens de magnitude da contagem bacteriana entre a cultura inicial e 5 a cultura coletada 72 horas após a administração de Microcyn 60.

O fracasso bacteriológico é indicado por uma redução de menos de três ordens de magnitude da contagem bacteriana na cultura em 72 horas pós-tratamento. Respostas 10 indeterminadas são documentadas naqueles casos nos quais o transporte da amostra foi retardado por mais de 48 horas, naqueles nos quais o raspado não foi imerso no meio de transporte, ou naqueles nos quais a amostra foi perdida. Eses casos estão fora da análise do estudo e são 15 substituídos por novos casos, até que aqueles dos 40 pacientes elegíveis fossem completados.

A fase de acompanhamento e de relatório começa quando o paciente termina a administração de Microcyn 60, e a partir da segunda visita. Nessa avaliação, de acordo com a 20 evolução clínica e com a presença de possíveis efeitos adversos, os pacientes são categorizados da seguinte forma:

Fracassos terapêuticos, caso seus sinais e sintomas iniciais não tenham sido eliminados, ou caso haja piora de sua condição geral com sintomas sistêmicos. Nesses casos, é 25 prescrito um antibiótico oral como, por exemplo, penicilina procaína, claritromicina ou azitromicina, na dose e pelo tempo que o médico assistente indicar, e eles são avaliados em uma semana.

Clinicamente curados, caso os sintomas e sinais que 30 estavam presentes na Visita 1 tenham sido eliminados.

Nesses casos em que o processo agudo é resolvido, o paciente recebe alta e é registrado como clinicamente curado. Em qualquer caso, pede-se que o paciente retorne para uma terceira visita de verificação em uma semana.

5           Evolução indeterminada. A evolução de qualquer paciente que não pode ser avaliado clinicamente por qualquer bom motivo; por exemplo, uma co-infecção, ou caso a avaliação tenha sido feita muito tarde, além de 72 horas. Nesses casos, os pacientes ainda podem ser incluídos na  
10 análise do estudo, desde que seja possível documentar o resultado do exsudato faríngeo e da cultura em 72 horas.

A análise estatística usada nesse estudo clínico leva em conta todos os pacientes que receberam pelo menos 18 enxágües de Microcyn 60 de 30 segundos cada, em um período  
15 de 72 horas. Esse mesmo critério é considerado para incluir qualquer paciente na análise de tolerância. O critério principal para análise da eficácia é a redução da contagem bacteriana de *Streptococcus β-hemolítico* por três ordens de magnitude na cultura realizada em 72 horas pós-tratamento  
20 com Microcyn 60. A análise estatística é realizada por meio de um teste pareado de amostras Wilcoxon. A análise estatística das variáveis clínicas é realizada com o uso do teste ANOVA para variáveis quantitativas. O número avaliável mínimo de pacientes é de 30 pacientes.

25           Um evento adverso é qualquer ocorrência médica em um paciente ou indivíduo sob investigação clínica ao qual um produto farmacêutico é administrado, e que não possui necessariamente um relacionamento causal com aquele medicamento. Um evento adverso pode, portanto, ser qualquer  
30 sinal desfavorável e indesejado (incluindo um achado

laboratorial anormal), sintoma ou doença temporariamente associados ao uso de um produto médico, seja ele considerado como relacionado a esse uso ou não. Condições preexistentes que se deterioraram durante um estudo são 5 registradas como eventos adversos.

O tratamento é suspenso em qualquer momento durante as 72 horas de duração em caso de eventos adversos que possuem intensidade moderada a grave. O tratamento subsequente é determinado pelo médico assistente. Dessa forma, de acordo 10 com esse exemplo, é demonstrada a eficácia de uma solução aquosa com ORP da presente invenção para o tratamento de sinusite.

#### EXEMPLO 13

Esse exemplo demonstra a atividade viricida de uma 15 solução aquosa com ORP exemplar contra Adenovírus - sorotipo 5. Para esse exemplo, foram usados vetores adenovirais (Ad) baseados no adenovírus humano do tipo 5, que são Ela-, parcialmente E1-b, e parcialmente E3 eliminados. Um plasmídeo *shuttle* que contém o gene repórter 20 da Proteína Verde Fluorescente (GFP) sob o controle de transcrição de pCMV foi preparado (pAd-Track). A recombinação homóloga desse plasmídeo pShuttle com plasmídeo AdEasy 1 foi realizada em bactérias eletrocompetentes. Os clones que tinham inserções foram 25 testados por digestões por endonuclease de restrição. Após confirmado, o plasmídeo DNA supercoiled foi transformado em células DH10B para amplificação em maior escala. Subseqüentemente, 293 células (ATCC 1573) foram cultivadas em meio sem soro (OptiMEM-GIBCO) e transfetadas com 30 plasmídeo recombinante digerido com *Pst*. As células

infectadas foram monitoradas quanto ao efeito citopático, coletadas e lisadas com três ciclos de congelamento e descongelamento. Os vírus resultantes (AdGFP) foram purificados com colunas AdenoPure (BD Clontech) de acordo 5 com as instruções do fabricante. Os vírus foram quantificados por OD 260/280. O rendimento final foi de 1,52 X 10<sup>11</sup> pfu/ml.

A eficácia da solução aquosa com ORP para inativação de adenovírus que codifica o gene da proteína verde 10 fluorescente (AdGFP) foi avaliada com a utilização de um teste baseado na detecção de emissão de fluorescência por células HeLa infectadas com vírus AdGFP de controle ou com AdGFP tratado com solução aquosa com ORP, usando citometria de fluxo ativada por fluorescência. A infecção de células 15 HeLa foi sempre feita com 7,5 X 10<sup>7</sup> pfu/ml (ou seja, 150 m.o.i.). Em todas as condições de teste, as células pareciam normais sob microscopia óptica. A fluorescência de fundo medida em células HeLa de controle foi de 0,06%. Após infecção com AdGFP de controle, 88,51% das células HeLa 20 expressavam GFP. Após exposição à solução aquosa com ORP, a infectividade do adenovírus diminuiu de forma inversamente proporcional ao período de exposição. Consequentemente, o vírus tratado com solução aquosa com ORP por 1, 5 e 10 minutos só podia expressar GFP em 2,8%, 0,13% e 0,09% de 25 culturas de células HeLa, respectivamente. Considerando a autofluorescência e a carga viral inicial para todas as condições testadas (ou seja, 7,5 X 10<sup>7</sup> pfu), a titulação infecciosa foi de 6,6 X 10<sup>7</sup> pfu no grupo AdGFP-HeLa de controle. Nos grupos em que o vírus foi tratado com a 30 solução aquosa com ORP, as titulações infecciosas foram de

2,0 X 10<sup>6</sup>, 5,2 X 10<sup>4</sup> e 2,2 X 10<sup>4</sup> em um, cinco e dez minutos de exposição do vírus à solução aquosa com ORP, respectivamente. Portanto, o fator de redução de log 10 foi de 1,5, 3,1 e 3,5 em um, cinco e dez minutos de exposição viral à solução aquosa com ORP. Considerados em conjunto, esses resultados demonstram que a exposição do vírus à solução aquosa com ORP por 5 minutos obtém uma redução de log 10 na carga viral > 3.

#### EXEMPLO 14

10 Esse exemplo demonstra a eficácia viricida de uma solução aquosa com ORP exemplar contra HIV com o uso do protocolo da "United States Environmental Protection Agency" para desinfecção de superfícies ambientais inanimadas.

15 A cepa SF33 de HIV-1 foi usada para esse estudo. Células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foram ativadas com PHA (3 µg/ml, Sigma) e IL-2 humana (20 U/ml, Roche) em meios HUT por três dias. As células foram lavadas e infectadas com a cepa com SF33. O sobrenadante foi coletado nos 4° e 6° dias, e testado quanto ao antígeno de HIV-1 p24 por ELISA (Beckman Coulter). O sobrenadante foi centrifugado para remover células e restos a 3.000 RPM por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido, dividido em alíquotas, e o vírus foi estocado a -80°C até o dia de sua utilização.

As alíquotas congeladas foram descongeladas a 37°C por dois minutos, imediatamente antes de sua utilização. Foram usadas diluições logarítmicas seriais (-1 a -5) em meio HUT. As películas de vírus foram preparadas espalhando-se

0,2 ml de inoculo de vírus uniformemente sobre os fundos de placas de Petri de poliestireno estéreis de 55 cm<sup>2</sup>. As películas de vírus foram secas ao ar em temperatura ambiente (21°C) em um gabinete de segurança biológica, até 5 que parecessem visivelmente secas (20 minutos) (para assegurar que a cepa do vírus (SF33) era capaz de replicar e causar efeitos citopáticos, o procedimento foi repetido com uma suspensão viral que havia permanecido em meio HUT sem ser seca).

10 A película de controle foi exposta a 2 ml de meios HUT por cinco minutos. O vírus foi raspado e diluído. Películas secas separadas foram expostas a 2 ml cada da solução aquosa com ORP por cinco minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de exposição, as placas foram raspadas e seu 15 conteúdo foi ressuspensos. A mistura de vírus-solução aquosa com ORP foi imediatamente diluída (10:1) em meio HUT. Diluições log seriais da suspensão resultante foram testadas quanto à infectividade (para controlar um possível efeito citotóxico direto da solução aquosa com ORP sobre 20 células MT-2, uma alíquota de 2 ml da solução aquosa com ORP foi diluída serialmente (10:1 até 10:5) em meio, e inoculada em culturas de células MT-2).

A linhagem de células MT-2 foi usada como a linhagem celular indicadora nos ensaios de infectividade. Essa 25 linhagem mostra um efeito citopático que consiste na formação de sincícios quando infectada com HIV-1. Quatro micropoços foram inoculados com 0,2 ml de cada diluição da suspensão reconstituída de vírus dos grupos de teste (reconstituídos em água com ORP) e de controle 30 (reconstituídos com meio de controle). Os controles de

células não infectadas célula foram inoculados somente com meio de teste. As culturas foram incubadas a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%.

As culturas foram pontuadas periodicamente a cada dois dias quanto à presença ou ausência de efeito citopático, 5 bem como quanto à presença de antígeno p24-HIV-1 por ELISA. A infecção experimental com HIV-1 de controle exerceu um efeito citopático e liberação de proteína Ag p24 no sobrenadante em culturas de MT-2 infectadas. Em contraste, o tratamento de HIV-1 com a solução aquosa com ORP por 10 cinco minutos, obteve um fator de redução de log > 3 na carga viral medida em culturas de MT-2 por ambos os ensaios. Dessa forma, esses resultados demonstram que o nível de eficácia está de em conformidade com as exigências da EPA para atividade viricida de HIV-1 sobre superfícies 15 inanimadas.

#### EXEMPLO 15

Esse exemplo demonstra o efeito de uma solução aquosa com ORP exemplar versus peróxido de hidrogênio (HP) sobre a viabilidade de fibroblastos diplóides humanos (HDFs). Para 20 estudar essa toxicidade potencial, os HDFs foram expostos *in vitro* à solução aquosa com ORP e ao peróxido de hidrogênio (HP). O HP é conhecido por ser tóxico para as células eucarióticas, aumentando a apoptose e a necrose e reduzindo a celular viabilidade. Nesse exemplo, viabilidade 25 celular, a apoptose e necrose a foram medidas em HDFs expostos à solução aquosa com ORP pura e a 880 mM de HP (uma concentração empregada para usos anti-sépticos de HP) por 5 e 30 minutos.

As culturas de HDF foram obtidas de três diferentes 30 prepúcios, que foram reunidos em *pool* e crio-preservados

juntos para serem utilizados nesse estudo. Só foram usadas células diplóides para todos os experimentos. Na análise do ciclo celular, a diploidia do DNA foi definida como a presença de um único pico G0-G1 com uma CV </= 7%, e um pico G2/M correspondente coletado de pelo menos 20.000 eventos totais. As FIG. 4A-4C apresentam os resultados, em que os tempos de exposição de 5 e 30 minutos são mostrados em barras brancas e pretas, respectivamente. A análise simultânea desses parâmetros foi realizada nas mesmas populações de células por citometria de fluxo usando: A) 7-aminoactinomicina D (7AAD); B) Anexina V-FITC; e C) Iodeto de propídio. As FIG. 4A-4C mostram os valores percentuais expressos como média ± DP (n=3).

A viabilidade celular foi de 75% e 55% após uma exposição de 5 minutos à solução aquosa com ORP e ao HP, respectivamente (FIG. 4A). Caso a exposição fosse prolongada até 30 minutos, a viabilidade celular diminuía ainda mais até 60% e 5%, respectivamente. Aparentemente, a solução aquosa com ORP induziu morte celular por meio de necrose, pois 15% das células incorporarão iodeto de propídio na análise por citometria de fluxo em ambos os tempos (FIG. 4C). A apoptose não parece ser o mecanismo pelo qual a solução aquosa com ORP induz morte celular, pois somente 3% das células tratadas com solução aquosa com ORP expuseram Anexina-V na superfície celular (um marcador de apoptose) (FIG. 4B). Essa percentagem foi, na verdade, similar àquela medida no grupo de controle. Por outro lado, HP induziu necrose em 20% e 75% das células tratadas e apoptose em 15% e 20% após 5 e 30 minutos de exposição, respectivamente. Em conjunto esses resultados mostram que a

solução aquosa com ORP (não diluída) é bem menos tóxica para HDFs do que uma concentração anti-séptica de HP.

#### EXEMPLO 16

Esse exemplo demonstra o efeito de uma solução aquosa com ORP exemplar em relação ao peróxido de hidrogênio (HP) sobre o dano oxidativo do DNA e a formação do aduto de DNA 8-hidróxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) em HDFs. Sabe-se que a produção de adutos de 8-OHdG em uma célula é um marcador de dano oxidativo em resíduos específicos de DNA. Além disso, níveis celulares elevados desse aduto estão correlacionados à mutagênese, carcinogênese e envelhecimento celular.

A FIG. 5 mostra os níveis de adutos de 8-OHdG presentes em amostras de DNA de HDFs após tratamentos de controle, tratamentos com solução aquosa com ORP e tratamentos com HP por 30 minutos. O DNA foi extraído logo após a exposição (T0, barras brancas) ou três horas após o período de ataque (T3, barras pretas). O DNA foi digerido e os adutos de 8-OHdG foram medidos pelo kit de ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Os valores são mostrados (ng/ml) como média  $\pm$  DP ( $n = 3$ ). A exposição à solução aquosa com ORP por 30 minutos não aumentou a formação de adutos nas células tratadas em comparação com células de controle após incubação por 30 minutos. Em contraste, o tratamento com 500  $\mu$ M de HP por 30 minutos aumentou o número de adutos de 8-OHdG em cerca de 25 vezes em relação às células tratadas de controle ou às células tratadas com solução aquosa com ORP.

As células tratadas com solução aquosa com ORP foram capazes de diminuir os níveis de adutos de 8-OHdG se

deixadas em DMEM suplementado por 3 horas após exposição à solução aquosa com ORP. Apesar de ter sido permitido o mesmo período de recuperação de 3 horas, as células tratadas com HP ainda apresentavam cerca de 5 vezes mais 5 adutos do que as células tratadas de controle ou que as células tratadas com solução aquosa com ORP. Em conjunto, esses resultados demonstram que a exposição aguda à solução aquosa com ORP não induz dano oxidativo do DNA significativo. Esses resultados também indicam que a 10 solução aquosa com ORP provavelmente não induzirá mutagênese ou carcinogênese *in vitro* ou *in vivo*.

#### EXEMPLO 17

Esse exemplo demonstra os efeitos sobre os HDFs da exposição crônica a concentrações baixas de uma solução 15 aquosa com ORP exemplar versus HP. Sabe-se que o estresse oxidativo crônico induz envelhecimento prematuro das células. A fim de simular um estresse oxidativo prolongado, culturas primárias de HDF foram expostas cronicamente a concentrações baixas da solução aquosa com ORP (10%) ou HP 20 (5  $\mu$ M) durante 20 duplicações da população. A expressão e a atividade da enzima SA- $\beta$ -galactosidase foram associadas previamente ao processo de envelhecimento *in vivo* e *in vitro*. Nesse exemplo, a expressão da enzima SA- $\beta$ -galactosidase foi analisada após um mês de exposição 25 contínua de HDF à solução aquosa com ORP ou HP. Os resultados são apresentados na FIG. 6. A expressão da enzima SA- $\beta$ -galactosidase foi analisada por contagem do número de células azuis em 20 campos microscópicos (para um exemplo do padrão de coloração, veja o Painel A). O Painel 30 B mostra que apenas o tratamento com HP acelerou o

envelhecimento das células, como indicado pelo número de células que superexpressam SA- $\beta$ -galactosidase ( $n = 3$ ). O tratamento crônico com uma dose baixa de HP aumentou a expressão de SA- $\beta$ -Gal em 86% das células, enquanto o 5 tratamento com a solução aquosa com ORP não induziu a superexpressão dessa proteína. Pode-se concluir a partir desse exemplo que a solução aquosa com ORP não é um indutor de envelhecimento celular prematuro.

#### EXEMPLO 18

10 Esse exemplo demonstra a eficácia de uma solução aquosa com ORP exemplar (Microcyn) na inibição da degranulação de mastócitos. Mastócitos foram reconhecidos como os principais participantes em distúrbios da hipersensibilidade do tipo I. Vários sintomas clínicos 15 observados na dermatite atópica, rinite alérgica e asma atópica são produzidos por estimulação de IgE-antígeno de mastócitos localizados em distintos tecidos afetados. A visão aceita atualmente da patogênese da asma atópica é que alérgenos iniciam o processo pelo acionamento de mastócitos 20 pulmonares que abrigam IgE (MCs) para a liberação de mediadores como, por exemplo, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, cininas, fator de ativação de plaquetas (PAF) etc. na denominada fase inicial da reação. Por sua vez, esses mediadores induzem broncoconstrição e aumentam a 25 permeabilidade vascular e a produção de muco. De acordo com esse modelo, após a ativação de mastócitos, aquelas células secretam várias citocinas pró-inflamatórias em uma fase tardia, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-4, IL-5 e IL-6, que participam no recrutamento e na 30 ativação locais de outras células inflamatórias como, por

exemplo, eosinófilos, basófilos, linfócitos T, plaquetas e fagócitos mononucleares. Essas células recrutadas, por sua vez, contribuem para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória que pode então se tornar autônoma e agravar os 5 sintomas asmáticos. Essa resposta da fase tardia constitui um processo de inflamação de longo prazo, que pode induzir alterações plásticas nos tecidos circundantes (veja Kumar e cols., pp. 193-268).

A estimulação antigênica de mastócitos ocorre por meio 10 da ativação do receptor de alta afinidade por IgE (o receptor Fc $\epsilon$ RI), que é uma proteína multimérica que se liga a IgE e subseqüentemente pode ser agregada pela interação da IgE ligada ao receptor com um antígeno específico. Sua estrutura compreende quatro polipeptídeos, uma cadeia  $\alpha$  de 15 ligação de IgE, uma cadeia  $\beta$  que serve para amplificar sua capacidade de sinalização e duas cadeias  $\gamma$  ligadas por dissulfeto, que são os principais condutores de sinal através do motivo de ativação de baseado no imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) codificado. As vias de 20 sinalização ativadas pelo entrecruzamento desse receptor foram caracterizadas com o uso de mastócitos derivados da medula óssea (BMMC), da linhagem de células de leucemia de ratos RBL 2H3, mastócitos peritoneais de camundongos e ratos e de outras linhagens de mastócitos como, por 25 exemplo, MC-9. Em todas elas, a presença de antígeno ligado a IgE causa degranulação de mastócitos, mobilização de cálcio, rearranjos citoesqueléticos e ativação de diferentes fatores de transcrição (NFAT, NF $\kappa$ B, AP-1, PU.1, SP1, Ets etc.) que ativam a transcrição do gene de 30 citocina, que culminam com a produção de citocina.

Mastócitos murídeos maduros derivados da medula óssea (BMMC) foram carregados com uma IgE monoclonal anti-dinitrofenol (300 ng/milhão de células) durante 4 horas a 37°C. O meio de cultura foi removido e as células foram re-suspensas em tampão fisiológico (tampão de Tyrode/BSA). As células foram então tratadas por 15 minutos a 37°C com concentrações distintas da solução aquosa com ORP (em sua modalidade Microcyn). O tampão foi removido e as células re-suspensas em tampão de Tyrode/BSA fresco, e estimuladas com diferentes concentrações de antígeno (albumina humana acoplada a dinitrofenol) durante uma incubação de 30 minutos a 37°C. A degranulação foi medida por determinação da atividade de  $\beta$ -hexosaminidase em sobrenadantes e péletes das células estimuladas, usando uma reação colorimétrica baseada na capacidade dessa enzima para hidrolisar distintos carboidratos (foi demonstrado que a  $\beta$ -hexosaminidase está localizada nos mesmos grânulos que contêm histamina em mastócitos.). Os resultados (FIG. 7) demonstram que a degranulação é significativamente reduzida com concentrações crescentes da solução aquosa com ORP.

Surpreendentemente, o efeito inibidor da solução aquosa com ORP (Microcyn) sobre a degranulação de mastócitos é pelo menos similar àquele observado com o "estabilizador de mastócitos" clinicamente eficaz e o composto antialérgico estabelecido cromoglicato de sódio (Intel<sup>TM</sup>). A degranulação foi novamente medida por atividade enzimática de  $\beta$ -hexosaminidase no pélete e no sobrenadante de células estimuladas, com o uso de uma reação colorimétrico baseado na capacidade dessa enzima para hidrolisar distintos carboidratos. Células carregadas

com IgE monoclonal anti-DNP foram estimuladas com ou sem uma pré-incubação de 15 minutos com cromoglicato de sódio (Intel™). O cromoglicato não foi mais eficaz do que a solução aquosa com ORP na redução de degranulações (compare 5 a FIG. 7 com a FIG. 8; ambos obtendo pelo menos cerca de 50% de redução da degranulação).

#### EXEMPLO 19

Esse exemplo demonstra a atividade inibidora de uma solução aquosa com ORP exemplar sobre a ativação de 10 mastócitos por um ionóforo de cálcio.

Os mastócitos podem ser estimulados por meio da ativação de fluxos de cálcio induzidos por um ionóforo de cálcio. As vias de sinalização ativadas por ionóforos de cálcio foram caracterizadas com o uso de mastócitos 15 derivados da medula óssea (BMMC), da linhagem de células de leucemia de ratos RBL 2H3, de mastócitos peritoneais de camundongos e ratos e de outras linhagens de mastócito como, por exemplo, MC-9. Em todos esses sistemas, a mobilização de cálcio causa a degranulação de mastócitos 20 (por exemplo, liberação de histamina), rearranjos citoesqueléticos e ativação de diferentes fatores de transcrição (por exemplo, NFAT, NFκB, AP-1, PU.1, SP1, Ets.), que ativam a transcrição do gene de citocina, que culminam com a produção e secreção de citocina.

25 BMMC murídeos maduros foram carregados com uma IgE monoclonal anti-dinitrofenol (300 ng/milhão de células) durante 4 horas a 37°C. O meio de cultura foi removido e as células foram re-suspensas em tampão fisiológico (tampão de Tyrode/BSA). As células foram então tratadas por 15 minutos 30 a 37°C com concentrações distintas da solução aquosa com

ORP (em sua modalidade Microcyn). O tampão foi removido e as células re-suspensas em tampão de Tyrode/BSA fresco, e estimuladas com ionóforo de cálcio (100 mM A23187) durante uma incubação de 30 minutos a 37°C. A degranulação foi medida por determinação da atividade de  $\beta$ -hexosaminidase em sobrenadantes e péletes das células estimuladas, usando uma reação colorimétrica baseada na capacidade dessa enzima para hidrolisar distintos carboidratos (foi demonstrado que a  $\beta$ -hexosaminidase está localizada nos mesmos grânulos que contêm histamina em mastócitos). Os resultados (FIG. 9) demonstram que a degranulação é significativamente reduzida com concentrações crescentes da solução aquosa com ORP.

Esses resultados sugerem que a solução aquosa com ORP é um inibidor não específico da liberação de histamina. Dessa forma, a solução aquosa com ORP – mesmo em diferentes concentrações – inibirá a degranulação de mastócitos, independentemente do estímulo (por exemplo, antígeno ou ionóforo). Sem se prender a nenhuma teoria em particular, a solução aquosa com ORP provavelmente modifica o sistema da via secretora no nível da membrana plasmática e/ou do citoesqueleto. Como o mecanismo de ação da solução aquosa com ORP supostamente é inespecífico, acredita-se que a solução aquosa com ORP possa ter amplas aplicações clínicas potenciais.

#### EXEMPLO 20

Esse exemplo demonstra o efeito de uma solução aquosa com ORP exemplar sobre a ativação de transcrição do gene de citocina de mastócitos.

As FIGS. 10A e 10B são ensaios de proteção de RNAase de mastócitos tratados com solução aquosa com ORP em

diferentes concentrações por 15 minutos, e ainda estimulados por antígeno, como descrito no Exemplo 20. Após estimulação, o mRNA foi extraído com o uso de colunas de cromatografia por afinidade (kit RNAeasy, Qiagene) e o ensaio de proteção de RNase foi realizado com o uso das condições-padrão do kit (Clontech, Becton & Dickinson), a fim de detectar a produção de mRNA de distintas citocinas após ataque com antígeno. As citocinas incluíam TNF- $\alpha$ , LIF, IL13, M-CSF, IL6, MIF e L32.

As FIGS. 10A e 10B mostram que a solução aquosa com ORP (Microcyn) não modificou os níveis de mRNA de citocina após ataque com antígeno em mastócitos, independentemente das concentrações de solução aquosa com ORP ou de antígeno usadas para o experimento.

Nesse estudo, o nível de transcritos (ou seja, o teor de RNA de mastócitos estimulados) de genes pró-inflamatórios não foi alterado em mastócitos tratados com solução aquosa com ORP após serem estimulados com várias concentrações de antígeno. Dessa forma, a solução aquosa com ORP inibiu a via secretora dessas citocinas, sem afetar sua transcrição.

#### EXEMPLO 21

Esse exemplo demonstra a atividade inibidora de uma solução aquosa com ORP exemplar sobre a secreção de TNF- $\alpha$  por mastócitos.

Os mastócitos foram tratados com diferentes concentrações de solução aquosa com ORP por 15 minutos, e ainda estimuladas por antígeno, como descrito no Exemplo 20. A seguir, o meio de cultura de tecido foi substituído, e as amostras do meio fresco foram coletadas em vários

períodos de tempo (2-8 horas) para medida dos níveis de TNF- $\alpha$ . As amostras foram congeladas e posteriormente analisadas com um kit ELISA comercial (Biosource) de acordo com as instruções do fabricante.

5 A FIG. 11 mostra que o nível de TNF- $\alpha$  secretada no meio por células tratadas com solução aquosa com ORP após estimulação com antígeno é significativamente diminuído, em comparação com as células não tratadas.

10 Dessa forma, a solução aquosa com ORP inibiu a secreção de TNF- $\alpha$  por mastócitos estimulados antígeno. Esse resultado é de acordo com observações clínicas de que o uso de soluções de água com ORP pode diminuir a reação inflamatória em várias feridas após procedimentos cirúrgicos.

15 EXEMPLO 22

Esse exemplo demonstra a atividade inibidora de uma solução aquosa com ORP exemplar sobre a secreção de MIP1- $\alpha$  por mastócitos.

20 Os mastócitos foram tratados com diferentes concentrações de uma solução aquosa com ORP exemplar (Microcyn) por 15 minutos, e ainda estimulados por antígeno, como descrito no Exemplo 20. A seguir, o meio de cultura do tecido foi substituído, e as amostras do meio fresco foram coletadas em vários períodos de tempo (2-8 horas) para medida dos níveis de MIP1- $\alpha$ . As amostras foram congeladas e posteriormente analisadas com um kit ELISA comercial (Biosource) de acordo com as instruções do fabricante.

25 A FIG. 12 mostra que o nível de MIP1- $\alpha$  secretado no meio por células tratadas com solução aquosa com ORP após

antígeno estimulação foi significativamente diminuído, em comparação com as células não tratadas.

Dessa forma, a solução aquosa com ORP inibiu a secreção de MIP1-a por mastócitos estimulados por antígeno.

5 Esse resultados estão de acordo com observações clínicas de que o uso de soluções de água com ORP pode diminuir a reação inflamatória em várias feridas após procedimentos cirúrgicos.

Os resultados de estudos análogos que medem a IL-6 e  
10 TT,<sup>13</sup> secreção são apresentados nas FIGS. 13 e 14.

Os Exemplos 19-21 e esse exemplo também demonstram que a solução aquosa com ORP é capaz de inibir respostas alérgicas da fase inicial e tardia iniciadas pelo entrecruzamento do receptor de IgE.

15 EXEMPLO 22

Esse exemplo demonstra a segurança de uma solução aquosa com ORP exemplar (Microcyn) quando pulverizada na cavidade nasal de coelhos.

Quarenta e dois coelhos foram distribuídos  
20 aleatoriamente em quatro grupos; Grupos I, II, III e IV (Tabela 6). Os coelhos foram tratados da seguinte forma: no Dia 0, foi administrado soro fisiológico estéril aos coelhos do Grupo I e cloreto benzalcônio foi administrado aos coelhos do Grupo II. Também no Dia 0, Microcyn foi  
25 administrada aos Grupos III e IV a 40 ppm e 80 ppm, respectivamente. Todos os artigos foram dosados por spray nasal na narina direita. No 7º Dia, após a 8ª dose, um terço dos coelhos de cada grupo foi sacrificado e submetidos a necropsia. Os animais restantes foram dosados diariamente  
30 até o 14º Dia, quando metade dos animais restantes de cada

grupo foi sacrificada e submetida a necropsia. No 21º Dia, após sete dias sem dosagem, os coelhos restantes foram sacrificados e submetidos a necropsia.

Tabela 6.

Grupo N°	Tratamento	Nº de coelhos sacrificados por dia		
		7º Dia	14º Dia	21º Dia
I	Soto fisiológico estéril	3	3	
II	Cloreto de banzalcônio	1	1	
III	Microcyn, 40 ppm	5	5	5
IV	Microcyn, 80 ppm	5	5	5

5 Foram coletadas amostras da mucosa nasal de ambas as narinas de cada coelho, e preservadas em formalina para análise histopatológica. Os tecidos preservados em formalina foram raspados, embebidos em parafina, cortados e corados com hematoxilina e eosina. Um patologista veterinário qualificado examinou todos os tecidos listados acima. A cavidade nasal foi seccionada em três níveis chamados níveis I, II e III da cavidade nasal, e os lados esquerdo e direito foram avaliados. O Nível I era a secção mais anterior, com algumas secções, mas nem todas, incluindo epitélio contendo folículo piloso. A maior parte desta região é forrada por epitélio escamoso estratificado. O Nível II é aproximadamente 1/3 posterior às narinas, e inclui o órgão vômero-nasal e grandes porções do turbinado. O Nível III é aproximadamente 2/3 posterior às narinas, e freqüentemente inclui pequenas porções do turbinado. Em cada nível, a cavidade nasal foi avaliada quanto à

10

15

20

integridade epitelial, cílios epiteliais, células inflamatórias, edema, células caliciformes, hiperplasia glandular e vasos sanguíneos. Os cortes foram classificados da seguinte forma: "mínima" representa a quantidade mínima de mudança, e normalmente exige uma pesquisa cuidadosa para ser identificado; "leve" é uma lesão pequena, mas facilmente identificável; "moderada" são lesões disseminadas ou grandes que não ocupam a porção principal do tecido; e "acentuada" é uma lesão grave que é grande e freqüentemente ocupa uma porção importante do tecido.

As alterações patológicas nos tecidos nasais foram geralmente limitadas aos níveis II e III e não foram observadas até o 14º Dia, com exceção e um único coelho no Grupo IV no 7º Dia. No 14º Dia, ocorreram aumentos não relacionados à dose tanto na incidência quanto na gravidade de necrose epitelial focal mínima a leve, hiperplasia e/ou atrofia epitelial ciliar em alguns coelhos dos Grupos III e Grupo IV, quando comparadas com as observadas em coelhos dos Grupos I ou II. Acompanhando as lesões epiteliais havia infiltrados focais de células inflamatórias linfocíticas, cuja presença persistiu até o 21º Dia. No 21º Dia, as lesões epiteliais de necrose ou atrofia ciliar não eram mais observadas nos coelhos tratados. A hiperplasia epitelial focal mínima observada em dois cortes no momento é considerada como sendo uma alteração de renovação/recuperação, na medida em que era durante a fase de tratamento do estudo. Alguns coelhos tratados com Microcyn tiveram hipocelularidade de células caliciformes ou hiperplasia de células caliciformes no período de 21 dias, mas essas alterações não eram diferentes daquelas

encontradas em controles. Infiltrados inflamatórios linfocíticos constituíram o achado principal ao final do período de teste de 21 dias. Um único coelho de controle teve necrose epitelial focal mínima no 21º Dia que foi 5 considerada como sendo um achado incidental.

Não houve um efeito relacionado à dose nítido relacionado à incidência ou gravidade das lesões mínimas a leves. Os infiltrados linfocíticos leves e a hiperplasia epitelial focal foram considerados como sendo normais e 10 alterações esperadas associadas à cicatrização/recuperação. Embora Microcyn tenha sido administrada na narina direita de todos os coelhos, não houve diferença substantiva no padrão de lesão/incidência entre os lados.

Esse exemplo demonstra que a administração intranasal 15 diária de 40 ou 80 ppm de Microcyn aos coelhos causou lesões mínimas a leves de necrose epitelial nasal focal, hiperplasia e/ou atrofia cílios epitelial ciliar por 14 (mas não 7) dias de tratamento.

#### EXEMPLO 24

20 Esse estudo demonstra a ausência de toxicidade de uma solução aquosa com ORP exemplar, Dermacyn.

Esse estudo demonstra a ausência de toxicidade de uma solução aquosa com ORP exemplar, Dermacyn.

Esse estudo foi feito de acordo com o padrão ISO 25 10993-5:1999 para determinar o potencial de uma solução aquosa com ORP exemplar, Dermacyn, para causar citotoxicidade. Um disco de filtro com 0,1 ml de Dermacyn foi colocado sobre uma superfície de agarose, cobrindo diretamente uma monocamada de células fibroblásticas de 30 camundongos (L-929). As amostras preparadas foram

observadas quanto ao dano citotóxico após 24 horas de incubação a 37°C, na presença de CO<sub>2</sub> 5%. As observações foram comparadas com amostras de controle positivo e negativo. As amostras que contêm Dermacyn não revelaram 5 qualquer evidência de lise celular ou de toxicidade, enquanto o controle positivo e negativo tiveram o desempenho que era antecipado.

Com base nesse estudo, concluiu-se que Dermacyn não gera efeitos citotóxicos sobre fibroblastos murídeos.

10 EXEMPLO 25

Esse estudo foi realizado com 16 ratos para avaliar a tolerabilidade local de uma solução aquosa com ORP exemplar, Dermacyn, e seus efeitos sobre a histopatologia de leitos de feridas em um modelo de cicatrização de ferida 15 de espessura total. As feridas foram feitas em ambos os lados do rato em questão. Durante o processo de cicatrização, foram retirados cortes de pele do lado esquerdo ou direito (por exemplo, tratado com Dermacyn e tratado com soro fisiológico, respectivamente).

20 Os cortes corados com tricromo de Masson e os cortes corados com Colágeno do Tipo II dos locais de feridas cirúrgicas tratados com Dermacyn e com soro fisiológico foram avaliados por um patologista veterinário credenciado. Os cortes foram testados quanto à quantidade de expressão 25 Colágeno do Tipo 2 como uma manifestação de proliferação de tecido conjuntivo, morfologia de fibroblastos e formação de colágeno, presença de neoepiderme no corte transversal, inflamação e extensão de ulceração dérmica.

Os achados indicam que Dermacyn foi bem tolerada em 30 ratos. não houve lesões histopatológicas relacionadas ao

tratamento nos cortes de pele das feridas de ambos os lados (tratadas com Dermacyn e tratadas com soro fisiológico, respectivamente). Não houve diferenças histopatológicas relevantes entre os locais de feridas tratados com soro fisiológico e os com Dermacyn, indicando que o tratamento com Dermacyn foi bem tolerado. Não houve diferenças significativas entre a expressão de Colágeno do Tipo 2 entre os locais de ferida tratados com soro fisiológico e os tratados com Dermacyn, indicando que Dermacyn não possui um efeito adverso sobre fibroblastos ou sobre a elaboração de colágeno durante o processo de cicatrização de feridas.

#### EXEMPLO 26

Esse exemplo demonstra o uso de uma água com potencial de oxirredução exemplar, Microcyn, de acordo com a invenção, como uma solução antimicrobiana eficaz.

Foi realizada uma avaliação *Time-Kill in vitro* com o uso da água com potencial de oxirredução Microcyn. Microcyn foi avaliada versus suspensões de ataque de cinqüenta cepas de microorganismos diferentes - vinte e cinco cepas da "American Type Culture Collection" (ATCC) e vinte e cinco isolados clínicos daquelas mesmas espécies - como descrito na "Tentative Final Monograph, Federal Register", 17 de junho de 1994, vol. 59: 116, pg. 31.444. As reduções percentuais e as reduções Log<sub>10</sub> da população inicial de cada cepa de ataque foram determinadas após exposições à Microcyn por trinta (30) segundos, um (1) minuto, três (3) minutos, cinco (5) minutos, sete (7) minutos, nove (9) minutos, onze (11) minutos, treze (13) minutos, quinze (15) minutos e vinte (20) minutos. Todo o plaqueamento em ágar foi feito em duplicata, e a Microcyn foi avaliada em uma

concentração de 99% (v/v). Todos os testes foram realizados de acordo com "Good Laboratory Practices", como especificado em 21 C.F.R. Parte 58.

A tabela a seguir resume os resultados da avaliação 5 Time-Kill *in vitro* mencionada acima na marca da exposição de trinta segundos para todas as populações testadas, que foram reduzidas em mais de 5,0 Log<sub>10</sub>:

**Tabela 8. Morte em 30 segundos *in vitro*.**

Nº	Espécie de microorganismo	População inicial (CFU/ml)	População pós-exposição (CFU/ml)	Redução Log <sub>10</sub>	Redução percentual
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC N°: 19003)	$2,340 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,3692	99,9999
2	<i>Acinetobacter baumannii</i> Isolado clínico BSLI #061901Ab3	$1,8150 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,2589	99,9999
3	<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC N°: 43858)	$4,40 \times 10^{10}$	$< 1,00 \times 10^3$	7,6435	99,9999
4	<i>Bacteroides fragilis</i>	$2,70 \times 10^{10}$	$< 1,00 \times 10^3$	7,4314	99,9999

	Isolado clínico BSLI #061901Bf6				
5	<i>Candida albicans</i> (ATCC N°: 10.231)	$2,70 \times 10^{10}$	$< 1,00 \times 10^3$	6,3345	99,9999
6	<i>Candida albicans</i> Isolado clínico BSLI #042905Ca	$5,650 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,7520	99,9999
7	<i>Enterobacte r aerogenes</i> (ATCC N°: 29007)	$1,2250 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0881	99,9999
8	<i>Enterobacte r aerogenes</i> Isolado clínico BSLI #042905Ea	$1,0150 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0065	99,9999
9	<i>Enterococcu s faecalis</i> (ATCC N°: 29.212)	$2,610 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,4166	99,9999
10	<i>Enterococcu s faecalis</i>	$1,2850 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,1089	99,9999

	Isolado clínico BSLI #061901Efs2				
11	<i>Enterococcus faecium</i> VRE, MDR (ATCC N° : 51.559)	$3,250 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,5119	99,9999
12	<i>Enterococcus faecium</i> Isolado clínico BSLI #061901Efml	$1,130 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0531	99,9999
13	<i>Escherichia coli</i> (ATCC N° : 11.229)	$5,00 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,6990	99,9998
14	<i>Escherichia coli</i> Isolado clínico BSLI #042905Ecl.	$3,950 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,5966	99,9997
15	<i>Escherichia coli</i> (ATCC N° : 25.922)	$6,650 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,8228	99,9998
16	<i>Escherichia coli</i> Isolado	$7,40 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,8692	99,9998

	clínico BSLI #042905Ec2				
17	<i>Haemophilus influenzae</i> (ATCC N° : 8149)	$1,5050 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^4$	5,1775	99,9993
18	<i>Haemophilus influenzae</i> Isolado clínico BSLI #072605Hi	$1,90 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^4$	5,2788	99,9995
19	<i>Klebsiella oxytoca</i> MDR (ATCC N° : 15.764)	$1,120 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0492	99,9999
20	<i>Klebsiella oxytoca</i> Isolado clínico BSLI #061901Ko1	$1,810 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,2577	99,9999
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (ATCC N° : 29.019)	$1,390 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,1430	99,9999

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
22	Isolado clínico BSLI #061901Kpn2	9,950 x 10 <sup>8</sup>	< 1,00 x 10 <sup>3</sup>	5,9978	99,9999
23	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC N° : 7.468)	6,950 x 10 <sup>8</sup>	< 1,00 x 10 <sup>3</sup>	5,8420	99,9999
24	<i>Micrococcus luteus</i> Isolado clínico BSLI #061901M12	1,5150 x 10 <sup>9</sup>	< 1,00 x 10 <sup>3</sup>	6,1804	99,9999
25	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC N° : 7.002)	1,5950 x 10 <sup>9</sup>	< 1,00 x 10 <sup>3</sup>	6,2028	99,9999
26	<i>Proteus mirabilis</i> Isolado clínico BSLI #061901Pm2	2,0950 x 10 <sup>9</sup>	< 1,00 x 10 <sup>3</sup>	6,3212	99,9999
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC N° : 15.442)	6,450 x 10 <sup>8</sup>	< 1,00 x 10 <sup>3</sup>	5,8096	99,9999

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
28	Isolado clínico BSLI #072605Pa	$1,3850 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,1414	99,9999
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC N° : 27.853)	$5,550 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,7443	99,9999
30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolado clínico BSLI #061901Pa2	$1,1650 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0663	99,9999
31	<i>Serratia marcescens</i> (ATCC N° : 14.756)	$9,950 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,9978	99,9999
32	<i>Serratia marcescens</i> Isolado clínico BSLI #042905Sm	$3,6650 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,5641	99,9999
33	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC N° : 6.538)	$1,5050 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,1775	99,9999

	<i>Staphylococcus aureus</i>				
34	Isolado clínico BSLI #061901Sal	$1,250 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0969	99,9999
35	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC N°: 29.213)	$1,740 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,2405	99,9999
36	<i>Staphylococcus aureus</i> Isolado clínico BSLI #061901Sa2	$1,1050 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0434	99,9999
37	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC N°: 12.228)	$1,0550 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,0233	99,9999
38	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Isolado clínico BSLI #072605Se	$4,350 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,6385	99,9998
9	<i>Staphylococcus</i> <i>cus</i>	$8,150 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,9112	99,9999

	<i>haemolyticus</i> (ATCC N° : 29.970)				
40	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Isolado clínico BSLI #042905Sha	$8,350 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,9217	99,9999
41	<i>Staphylococcus hominis</i> (ATCC N° : 27844)	$2,790 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,4456	99,9996
42	<i>Staphylococcus hominis</i> Isolado clínico BSLI #042905Sho	$5,20 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,7160	99,9998
43	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC N° : 35552)	$9,10 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^3$	5,9590	99,9999
44	<i>Staphylococcus</i> <i>cus</i>	$1,4150 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,1508	99,9999

	<i>saprophyticus</i> Isolado clínico BSLI #042905Ss				
45	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC N°: 33.400)	$2,1450 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^4$	5,3314	99,9995
46	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC N°: 19615)	$5,20 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,7160	99,9999
47	<i>Streptococcus pyogenes</i> Isolado clínico BSLI #061901 Spy7	$2,5920 \times 10^9$	$< 1,00 \times 10^3$	6,4141	99,9999

Embora suas reduções microbianas tenham sido medidas em menos de 5,0 Log<sub>10</sub>, Microcyn também demonstrou atividade antimicrobiana contra as três espécies restantes não incluídas na Tabela 8. Mais especificamente, uma exposição de trinta segundos à Microcyn reduziu a população de *Streptococcus pneumoniae* (Isolado clínico; BSLI #072605Spn1) em mais de 4,5 Log<sub>10</sub>, que era o limite de detecção versus essa espécie. Além disso, quando atacado

com *Candida tropicalis* (ATCC N°: 750), Microcyn demonstrou uma redução microbiana em mais de 3,0 Log<sub>10</sub> após uma exposição de trinta segundos. Adicionalmente, quando atacada com *Candida tropicalis* (BSLI #042905Ct), Microcyn 5 demonstrou uma redução microbiana em mais de 3,0 Log<sub>10</sub> após uma exposição de vinte minutos.

Os resultados exemplares dessa avaliação Time-Kill *in vitro* demonstram que a água com potencial de oxirredução Microcyn exibe atividade antimicrobiana rápida (ou seja, 10 menos de 30 segundos na maioria dos casos) versus um amplo espectro de microorganismos de ataque. As populações microbianas de quarenta e sete de cinqüenta espécies Gram-positivas, Gram-negativas e de leveduras avaliadas foram reduzidas em mais de 5,0 Log<sub>10</sub> em um intervalo de até 15 trinta segundos de exposição ao produto.

#### EXEMPLO 27

Esse exemplo demonstra uma comparação da atividade antimicrobiana de uma água com potencial de oxirredução exemplar, Microcyn, usada de acordo com a invenção, versus 20 solução de gluconato de clorexidina 4,0% (p/v) HIBICLENS® e irrigação de cloreto de sódio 0,9% (USP).

Foi realizada uma avaliação Time-Kill *in vitro*, como descrito no Exemplo 26, com a utilização de solução de gluconato de clorexidina 4,0% (p/v) HIBICLENS® e uma 25 solução de irrigação estéril de cloreto de sódio 0,9% (USP) como produtos de referência. Cada produto de referência foi avaliado versus suspensões das dez cepas da "American Type Culture Collection" (ATCC) especificamente citadas na "Tentative Final Monograph". Os dados coletados foram então 30 analisados contra a atividade de redução microbiana

Microcyn registrada no Exemplo 26.

A água com potencial de oxirredução Microcyn reduziu as populações microbianas de cinco das cepas de ataque a um nível comparável àquele observado para a solução de 5 gluconato de clorexidina HIBICLENS®. Tanto Microcyn quanto HIBICLENS® geraram uma redução microbiana de mais de 5,0 Log<sub>10</sub> após uma exposição de trinta segundos às seguintes espécies: *Escherichia coli* (ATCC N°: 11.229 e ATCC N°: 25.922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N°: 15.442 e ATCC N°: 10 27.853) e *Serratia marcescens* (ATCC N°: 14.756). Além disso, como mostrado acima na Tabela 7, Microcyn demonstrou excelente atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* (ATCC N°: 7.468) ao gerar uma redução de 5,8420 Log<sub>10</sub> após uma exposição de trinta segundos. No entanto, 15 uma comparação direta da atividade de *Micrococcus luteus* (ATCC N°: 7468) com HIBICLENS® não foi possível porque, após uma exposição de trinta segundos, HIBICLENS® reduziu a população pelo limite de detecção do teste (nesse caso específico, em mais de 4,8 Log<sub>10</sub>). Observa-se que a solução 20 de irrigação estéril de cloreto de sódio 0,9% reduziu as populações microbianas de cada uma das seis cepas de ataque discutidas acima por menos de 0,3 Log<sub>10</sub> após uma exposição completa de vinte minutos.

A água com potencial de oxirredução Microcyn forneceu 25 uma atividade antimicrobiana maior do que HIBICLENS® e do que a irrigação com cloreto de sódio para quatro das cepas de ataque testadas: *Enterococcus faecalis* (ATCC N°: 29.212), *Staphylococcus aureus* (ATCC N°: 6.538 e ATCC N°: 29.213) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC N°: 12.228). A 30 tabela a seguir resume os resultados da redução microbiana

da avaliação Time-Kill *in vitro* para essas quatro espécies:

**Tabela 8. Resultados comparativos**

<b>Espécie de microorganismo</b>	<b>Tempo de exposição</b>	<b>Redução Log<sub>10</sub></b>		
		<b>Microcyn</b>	<b>HIBICLENS</b>	<b>Irrigação com NaCl</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29.212)	30 segundos	6,4166	1,6004	0,3180
	30 segundos	6,4166	1,6004	0,3180
	1 minuto	6,4166	2,4648	0,2478
	3 minutos	6,4166	5,2405	0,2376
	5 minutos	6,4166	5,4166	0,2305
	7 minutos	6,4166	5,4166	0,2736
	9 minutos	6,4166	5,4166	0,2895
	11 minutos	6,4166	5,4166	0,2221
	13 minutos	6,4166	5,4166	0,2783
	15 minutos	6,4166	5,4166	0,2098
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6.538)	20 minutos	6,4166	5,4166	0,2847
	30 segundos	6,1775	1,1130	0,0000
	1 minuto	6,1775	1,7650	0,0191
	3 minutos	6,1775	4,3024	0,0000
	5 minutos	6,1775	5,1775	0,0000
	7 minutos	6,1775	5,1775	0,0000
	9 minutos	6,1775	5,1775	0,0000
	11 minutos	6,1775	5,1775	0,0267
	13 minutos	6,1775	5,1775	0,0000
	15 minutos	6,1775	5,1775	0,0191
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 3	20 minutos	6,1775	5,1775	0,0000
	30 segundos	6,2405	0,9309	0,0000
	1 minuto	6,2405	1,6173	0,0000
	3 minutos	6,2405	3,8091	0,0460

29.213)	5 minutos	6,2405	5,2405	0,0139
	7 minutos	6,2405	5,2405	0,0000
	9 minutos	6,2405	5,2405	0,0113
	11 minutos	6,2405	5,2405	0,0283
	13 minutos	6,2405	5,2405	0,0000
	15 minutos	6,2405	5,2405	0,0000
	20 minutos	6,2405	5,2405	0,0615
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC N°: 12.228)	30 segundos	5,6385	5,0233	0,0456
	1 minuto	5,6385	5,0233	0,0410
	3 minutos	5,6385	5,0233	0,0715
	5 minutos	5,6385	5,0233	0,0888
	7 minutos	5,6385	5,0233	0,0063
	9 minutos	5,6385	5,0233	0,0643
	11 minutos	5,6385	5,0233	0,0211
	13 minutos	5,6385	5,0233	0,1121
	15 minutos	5,6385	5,0233	0,0321
	20 minutos	5,6385	5,0233	0,1042

Os resultados dessa avaliação Time-Kill *in vitro* comparativa demonstram que a água com potencial de oxirredução Microcyn não apenas exibe atividade antimicrobiana comparável com HIBICLENS® contra *Escherichia coli* (ATCC N°: 11.229 e ATCC N°: 25.922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC N°: 15.442 e ATCC N°: 27.853), *Serratia marcescens* (ATCC N°: 14.756) e *Micrococcus luteus* (ATCC N°: 7.468), mas fornece um tratamento mais eficaz contra *Enterococcus faecalis* (ATCC N°: 29.212), *Staphylococcus aureus* (ATCC N°: 6.538 e ATCC N°: 29.213) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC N°: 12.228). Como mostrado na Tabela 8, Microcyn exemplifica uma resposta antimicrobiana mais rápidas (ou seja, menos de 30 segundos) em algumas

espécies. Além disso, a exposição à Microcyn resulta em uma redução microbiana global maior em todas as espécies listadas na Tabela 8.

EXEMPLO 28

5 Esse exemplo demonstra a eficácia de uma solução aquosa com ORP contra *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina (ATCC 51.915).

Uma cultura de *Streptococcus pneumoniae* foi preparada com o uso de uma cultura congelada para inocular múltiplas placas BAP, e incubação por 2-3 dias a 35-37°C com CO<sub>2</sub>.  
10 Após a incubação, 3-7 ml de diluente/meio estéril foram transferidos para cada placa de ágar e raspadas para suspender o organismo. As suspensões de todas as placas foram coletadas e transferidas para um tubo estéril e  
15 comparadas com um Padrão de McFarland 4.0. A suspensão foi filtrada através de uma gaze estéril, e misturada por turbilhonamento antes do uso no procedimento de teste.

Um inóculo de 0,1 ml da suspensão do organismo foi adicionado a 49,9 ml da Microcyn ou da substância de  
20 controle. Em cada período de exposição, a mistura de teste foi misturada por agitação. A mistura de teste foi exposta por 15 segundos, 30 segundos, 60 segundos, 120 segundos, 5 minutos e 15 minutos a 25,0°C.

Uma amostra de 1,0 ml foi removida da mistura de teste  
25 e adicionada a 9,0 ml de neutralizante, representando uma diluição de 100 da mistura de teste inoculada neutralizada. Uma alíquota de 5 ml da mistura de teste inoculada neutralizada 100 foi transferida para um aparelho de filtro de 0,45 microlitro pré-umedecido com 10 ml de tampão de  
30 Butterfield. O filtro foi enxaguado com aproximadamente 50

ml de tampão de Butterfield, removido assepticamente do aparelho, e transferido para uma placa BAP. Foram preparadas diluições seriais adicionais 1:10, e alíquotas de um (1,0) ml das diluições 10-3- 10-4 da mistura de teste 5 neutralizada inoculada foram plaqueadas em duplicata em BAP.

As placas de subcultura bacteriana foram incubadas por 48 ± 4 horas a 35-37°C em CO<sub>2</sub>. As placas de subcultura foram refrigeradas por dois a 2-8°C, antes de serem 10 examinadas. Após incubação e estocagem, as placas de ágar foram observadas visualmente quanto à presença de crescimento. As unidades formadoras de colônia foram enumeradas, e o número de sobreviventes em cada tempo de exposição foi determinado. Sub-culturas representativas que 15 demonstram crescimento foram examinadas adequadamente para confirmação dos organismos de teste.

A solução aquosa com ORP exemplar, Microcyn, demonstrou uma redução >99,93197279% de *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina (ATCC 51.915) após 20 tempos de contato de 15 segundos, 30 segundos, 60 segundos, 120 segundos, 5 minutos e 15 minutos a 25,0°C.

#### EXEMPLO 29

O objetivo desse Exemplo é determinar a atividade microbiana de uma solução aquosa com ORP exemplar 25 (Dermacyn) versus bacitracina com a utilização de um ensaio suspensão bacteriana.

Dermacyn é um produto pronto para uso e, portanto, a realização de diluições durante o teste não foi necessária. A bacitracina é uma solução re-hidratada concentrada que 30 necessita de uma diluição até 33 Unidades/ml.

Uma suspensão de esporos de *B. atropheus* a  $2,5 \times 10^7$  /ml adquirida foi usada para o teste. Além disso, suspensões frescas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram preparadas e medidas com o uso 5 de um espectrofotômetro para assegurar que a titulação era aceitável.

Nove microlitros da substância de teste foram adicionados a 100 µl de suspensão de micróbios. A mistura de teste foi mantida a 20°C pelos tempos de contato de 20 10 segundos, 5 minutos e 20 minutos. Um ml da mistura de teste (toda a mistura) foi adicionado a 9,0 ml de neutralizante por 20 minutos (esse é o tubo de neutralização original ou ONT). Um ml da mistura de teste neutralizada foi plaqueado em ágar tríptico de soja em duplicata pelos tempos de 15 contato de 5 minutos e 20 minutos. Foram usadas diluições e placas cobertas adicionais para o ponto de 20 segundos, para se obter placas contáveis.

Todas as placas foram incubadas a 30°C-35°C por um total de 3 dias e foram avaliadas após cada dia de 20 incubação. Para determinar o número de micróbios expostos à Dermacyn e Bacitracina durante os testes, foram feitas quatro diluições de 10 vezes das suspensões, e 1,0 ml das 2 diluições finais foi plaqueado em duplicata, quando aplicável.

25 Dermacyn, quando atacada com os organismos de teste, mostrou erradicação total (redução >4 log) das bactérias vegetativas em todos os pontos de tempo e, para esporos, nos pontos de tempo de 5 e 20 minutos. Bacitracina só produziu uma redução de aproximadamente 1 log. Microcyn no ponto de tempo de 20 segundos mostrou alguma redução de 30

esporos. Bacitracina não apresentou evidências de redução das populações bacterianas ou de esporos ao longo dos períodos de tempo testados.

#### EXEMPLO 30

5 Esse exemplo demonstra a eficácia de duas soluções de água com ORP exemplares (M1 e M2) contra bactérias em biofilmes.

A cepa parente para todos os estudos é *P. aeruginosa* PAO1. Todas as cepas planctônicas cresceram aerobicamente  
 10 em meio mínimo (2,56 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,08 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,04 g de CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 0,1 mg CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O, 0,1 mg de ZnSO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O, 0,1 mg de FeSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O e 0,004 mg de MnCl<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O por litro, pH 7,2) a 22°C em frascos em agitação a 220 rpm. Os biofilmes cresceram como  
 15 descrito abaixo a 22°C em meio mínimo. Glutamato (130 mg/litro) foi usado como a única fonte de carbono.

Os biofilmes cresceram como descrito previamente (Sauer e cols., *J. Bacteriol.* 184: 1.140-1.154 (2002), que é aqui incorporado por referência). Resumidamente, as  
 20 superfícies interiores de tubos de silicone de um sistema de reator com tubo de fluxo contínuo once-through foram usadas para o cultivo de biofilmes a 22°C. Os biofilmes foram coletados após 3 dias (estágio de maturação-I), 6 dias (estágio de maturação-2) e 9 dias (estágio de  
 25 dispersão) de crescimento sob condições de fluxo. As células do biofilme foram coletadas da superfície interior pinçando-se o tubo ao longo de todo o seu comprimento, produzindo uma extrusão do material celular do lúmen. A pasta de células resultante foi coletada em gelo. Antes da  
 30 amostragem, o volume líquido foi expurgado do tubo para

evitar interferência de células planctônicas destacadas.

O tamanho da população de células planctônicas e do biofilme foi determinado pelo número de CFU com o uso de contagens de placa de diluição serial. Para isso, os 5 biofilmes foram coletados da superfície interior após vários períodos de tempo de exposição até SOSS. As imagens dos biofilmes desenvolvidos em células de fluxo once-through foram visualizadas por luz transmitida com um microscópio Olympus BX60 (Olympus, Melville, NY) e uma lente objetiva com ampliação de 100 A100PL. As imagens foram capturadas com o uso de uma câmera Magnafire resfriada carregada com três chips (Optronics Inc., Galena, CA) e uma exposição de 30 ms. Além disso, foi realizada microscopia a laser com varredura confocal com um 10 microscópio invertido LSM 510 Meta (Zeiss, Heidelberg, Alemanha). As imagens foram obtidas com uma lente LD-APOCHROME 40/0.6 e com o software LSM 510 Meta (Zeiss). 15

Foi observada uma redução de 2-log para os biofilmes tratados com M1 em 60 mm de tratamento. O achado indica que 20 cada 10,8 min (+/- 2,8 min), o tratamento com M1 resulta em uma redução de 50% da viabilidade do biofilme.

**Tabela 9. Morte por M1.**

Tempo (min)	Viabilidade (%)
0	100
10	50
20	25
34	12,5
47	6,25
54	3,125

No entanto, de forma geral, M2 foi um pouco mais

eficaz na morte de biofilmes do que M1, pois os resultados indicaram que a cada 4,0 min (+/- 1,2 min) o tratamento com M2 resulta em uma redução de 50% na viabilidade do biofilme.

5 Tabela 10. Morte por M2.

Tempo (min)	Viabilidade (%)
0	100
2,5	50
7	25
12	12,5
15	6,25
20	3,125

Dessa forma, a água com ORP é eficaz contra bactérias em biofilmes.

Todas as referências aqui citadas, incluindo publicações, pedidos de patentes e patentes, são aqui 10 incorporadas por referência na mesma extensão como se cada referência fosse individual e especificamente indicada para ser incorporada por referência e fosse aqui apresentada em sua totalidade.

O uso dos termos "um", "uma", "a" e "o" e referentes 15 similares no contexto da descrição da invenção (especialmente no contexto das reivindicações a seguir) devem ser considerados como englobando tanto as formas no singular quanto no plural, a menos que aqui indicado de outra forma ou claramente contradito pelo contexto. Os 20 termos "que compreende", "que possui", "que inclui" e "que contém" devem ser considerados como termos em aberto (ou seja, significando "incluindo, sem limitação"), a menos que observado de forma diferente. A citação de intervalos de

valores nessa especificação vira meramente servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado incluído no intervalo, a menos que aqui indicado de forma diferente, e cada valor separado é incorporado na 5 especificação como se fosse individualmente aqui citado. Todos os métodos aqui descritos podem ser realizados em qualquer ordem adequada, a menos que aqui indicado de forma diferente ou de algum outro modo claramente contradito pelo contexto. O uso de qualquer um e de todos os exemplos, ou 10 linguagem exemplar (por exemplo, "tais como") aqui fornecidos, visa simplesmente melhor ilustrar a invenção, e não impõe uma limitação ao escopo da invenção, a menos que reivindicado de forma diferente. Nenhuma linguagem na especificação deve ser considerada como indicativa de 15 qualquer elemento não reivindicado como essencial à prática da invenção.

São aqui descritas modalidades preferidas dessa invenção, incluindo o melhor modo conhecido pelos inventores para realizar a invenção. Variações destas 20 modalidades preferidas podem ser evidentes àqueles habilitados na técnica mediante a leitura da descrição precedente. Os inventores esperam que aqueles habilitados na técnica empreguem estas variações da forma adequada, e os inventores têm a intenção de que a invenção seja 25 praticada de uma forma diferente em relação àquela aqui descrita especificamente. Conseqüentemente, essa invenção inclui todas as modificações e equivalentes da matéria em questão citadas nas reivindicações em anexo, da forma permitida pela lei aplicável. Além disso, qualquer 30 combinação dos elementos descritos acima em todas as

variações possíveis deste, é englobada pela invenção, a menos que aqui indicado de forma diferente ou de algum outro modo claramente contradito pelo contexto.

PI0706677-5

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento ou prevenção de sinusite em um paciente caracterizado pelo fato de compreender a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma solução aquosa com potencial de oxirredução, em que a solução é estável por pelo menos cerca de vinte e quatro horas e possui um pH de cerca de 6,4 a cerca de 7,8.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a administração da solução aquosa com potencial de oxirredução na via aérea respiratória superior.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender o contato de um ou mais tecidos na via aérea respiratória superior com a solução aquosa com potencial de oxirredução.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender o contato do tecido em um ou mais seios cranianos com a solução aquosa com potencial de oxirredução.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que um ou mais seios cranianos são selecionados do grupo que consiste em seios frontais, seios maxilares, seios etmóides e seios esfenóides, e combinações destes.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a administração da solução aquosa com potencial de oxirredução a um ou mais seios etmóides.

30 7. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de compreender o contato de um ou mais tecidos nos seios etmóides com a solução aquosa com potencial de oxirredução.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
5 caracterizado pelo fato de compreender a administração intranasal da solução aquosa com potencial de oxirredução.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
10 caracterizado pelo fato de compreender a administração da solução aquosa com potencial de oxirredução através de um ou mais orifícios da boca ou do nariz.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
caracterizado pelo fato de compreender a liberação da solução aquosa com potencial de oxirredução na forma de um líquido, spray, névoa, aerossol ou vapor.

15 11. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
caracterizado pelo fato de que a solução aquosa de potencial de oxirredução é administrada por aerossolização, nebulização ou atomização.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
20 caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução é administrada na forma de gotículas que possuem um diâmetro na faixa de cerca de 0,1 mícron a cerca de 100 mícrons.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
25 caracterizado pelo fato de que a sinusite é sinusite aguda.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
caracterizado pelo fato de que a sinusite é sinusite crônica.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
30 caracterizado pelo fato de que a sinusite resulta de uma

reação alérgica.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
caracterizado pelo fato de que a sinusite resulta de asma.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
5 caracterizado pelo fato de que a sinusite resulta de uma  
infecção.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17,  
caracterizado pelo fato de que a infecção é por um ou mais  
microorganismos selecionados do grupo que consiste em  
10 vírus, bactérias e fungos.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18,  
caracterizado pelo fato de que a infecção é por um ou mais  
vírus selecionados do grupo que consiste em vírus  
coxsackie, adenovírus, rinovírus e vírus influenza.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18,  
15 caracterizado pelo fato de que a infecção é por uma ou mais  
bactérias selecionadas do grupo de *Streptococcus*  
*pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, estafilococos,  
estreptococos não pneumocócicos, corinebactéria e  
20 anaeróbicas.

21. Método, de acordo com a reivindicação 18,  
caracterizado pelo fato de que a infecção é por um ou mais  
fungos selecionados do grupo de zigomicetos, aspergilo e  
cândida.

22. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
25 caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com  
potencial de oxirredução é administrada em combinação com  
até cerca de 25% de um ou mais veículos.

23. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
30 caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com

potencial de oxirredução é administrada em combinação com até cerca de 50% de um ou mais veículos.

24. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com 5 potencial de oxirredução é administrada em combinação com até cerca de 75% de um ou mais veículos.

25. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com 10 potencial de oxirredução é administrada em combinação com até cerca de 90% de um ou mais veículos.

26. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução é administrada em combinação com até cerca de 95% de um ou mais veículos.

15 27. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução é administrada em combinação com até cerca de 99% de um ou mais veículos.

28. Método, de acordo com a reivindicação 22, 20 caracterizado pelo fato de que um ou mais veículos são selecionados do grupo que consiste em água estéril, solução salina e combinações destes.

29. Método, de acordo com a reivindicação 23, 25 caracterizado pelo fato de que um ou mais veículos são selecionados do grupo que consiste em água estéril, solução salina e combinações destes.

30. Método, de acordo com a reivindicação 24, 30 caracterizado pelo fato de que um ou mais veículos são selecionados do grupo que consiste em água estéril, solução salina e combinações destes.

31. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que um ou mais veículos são selecionados do grupo que consiste em água estéril, solução salina e combinações destes.

5 32. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que um ou mais veículos são selecionados do grupo que consiste em água estéril, solução salina e combinações destes.

10 33. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um ou mais veículos são selecionados do grupo que consiste em água estéril, solução salina e combinações destes.

15 34. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH da solução aquosa com potencial de oxirredução é de cerca de 7,4 a cerca de 7,6.

35. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução é estável por pelo menos cerca de duas semanas.

20 36. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução é estável por pelo menos cerca de dois meses.

25 37. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução é estável por pelo menos cerca de seis meses.

30 38. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução é estável por pelo menos cerca de

um ano.

39. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução compreende água reduzida em uma 5 quantidade de cerca de 10% a cerca de 50% por volume da solução.

40. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução compreende água reduzida em uma 10 quantidade de cerca de 20% a cerca de 40% por volume da solução.

41. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução compreende água oxidada em uma 15 quantidade de cerca de 50% a cerca de 90% por volume da solução.

42. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução compreende de cerca de 10% por 20 volume a cerca de 50% por volume de água reduzida e de cerca de 50% por volume a cerca de 90% por volume de água oxidada.

43. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com 25 potencial de oxirredução compreende pelo menos uma espécie de cloro livre selecionada do grupo que consiste em ácido hipocloroso, íons hipoclorito, hipoclorito de sódio, íons clorito, e combinações destes.

44. Método, de acordo com a reivindicação 1, 30 caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com

potencial de oxirredução compreende de cerca de 15 ppm a cerca de 35 ppm de ácido hipocloroso.

45. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com 5 potencial de oxirredução compreende de cerca de 25 ppm a cerca de 50 ppm de hipoclorito de sódio.

46. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com 10 potencial de oxirredução compreende de cerca de 15 ppm a cerca de 35 ppm de ácido hipocloroso, de cerca de 25 ppm a cerca de 50 ppm de hipoclorito de sódio, um pH de cerca de 6,2 a cerca de 7,8, e a solução é estável por pelo menos cerca de uma semana.

47. Método, de acordo com a reivindicação 1, 15 caracterizado pelo fato de que a solução aquosa com potencial de oxirredução possui um potencial de cerca de - 400 mV a cerca de +1.300 mV.

48. Método, de acordo com a reivindicação 1, 20 caracterizado pelo fato de compreender ainda a administração de pelo menos um agente terapêutico adicional do grupo que consiste em anti-histamínicos, descongestionantes, agentes antiinfecciosos, agentes antiinflamatórios, e combinações destes.

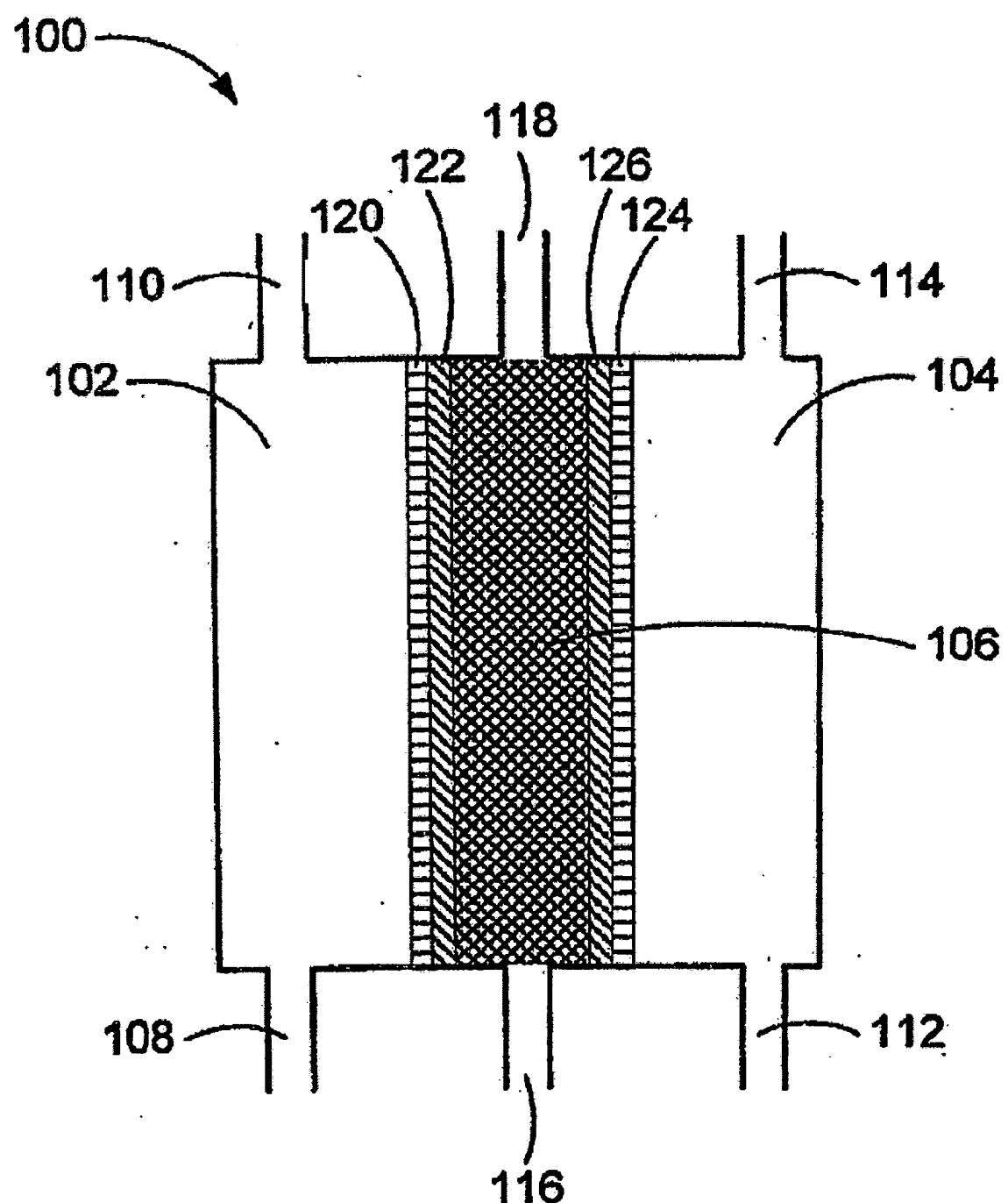
**FIG. 1**

FIG. 2

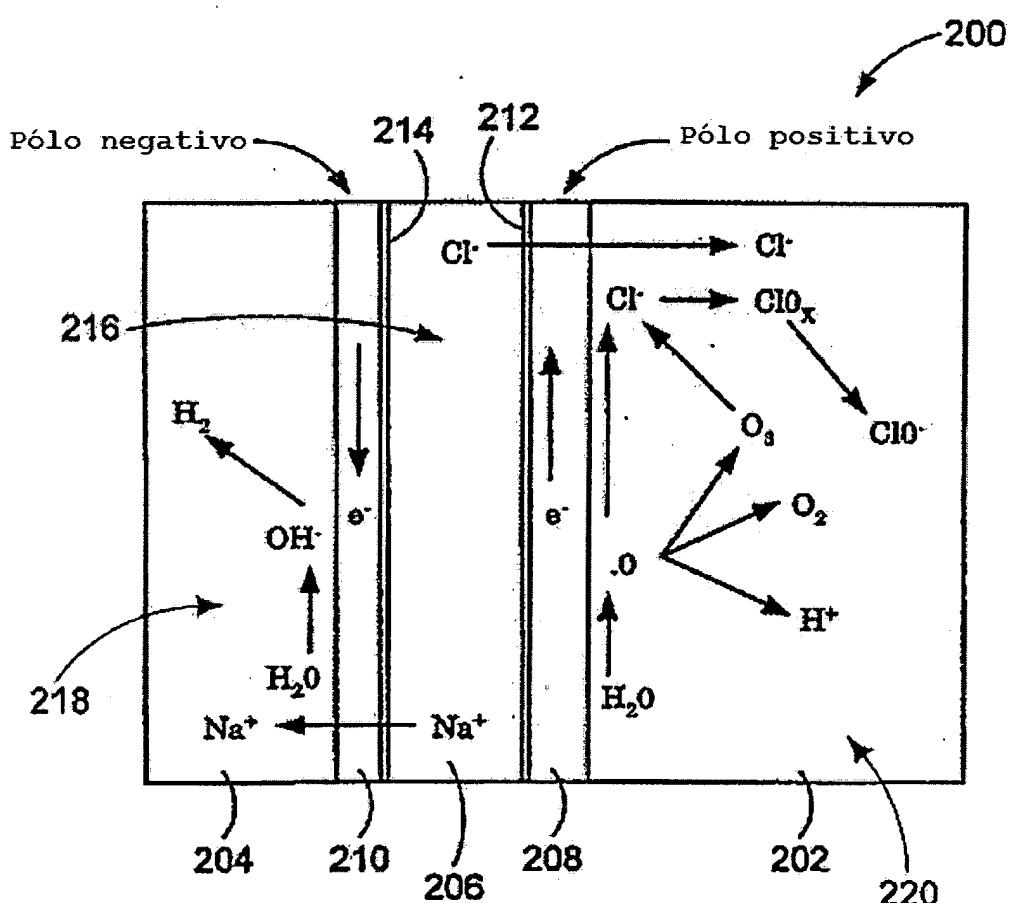
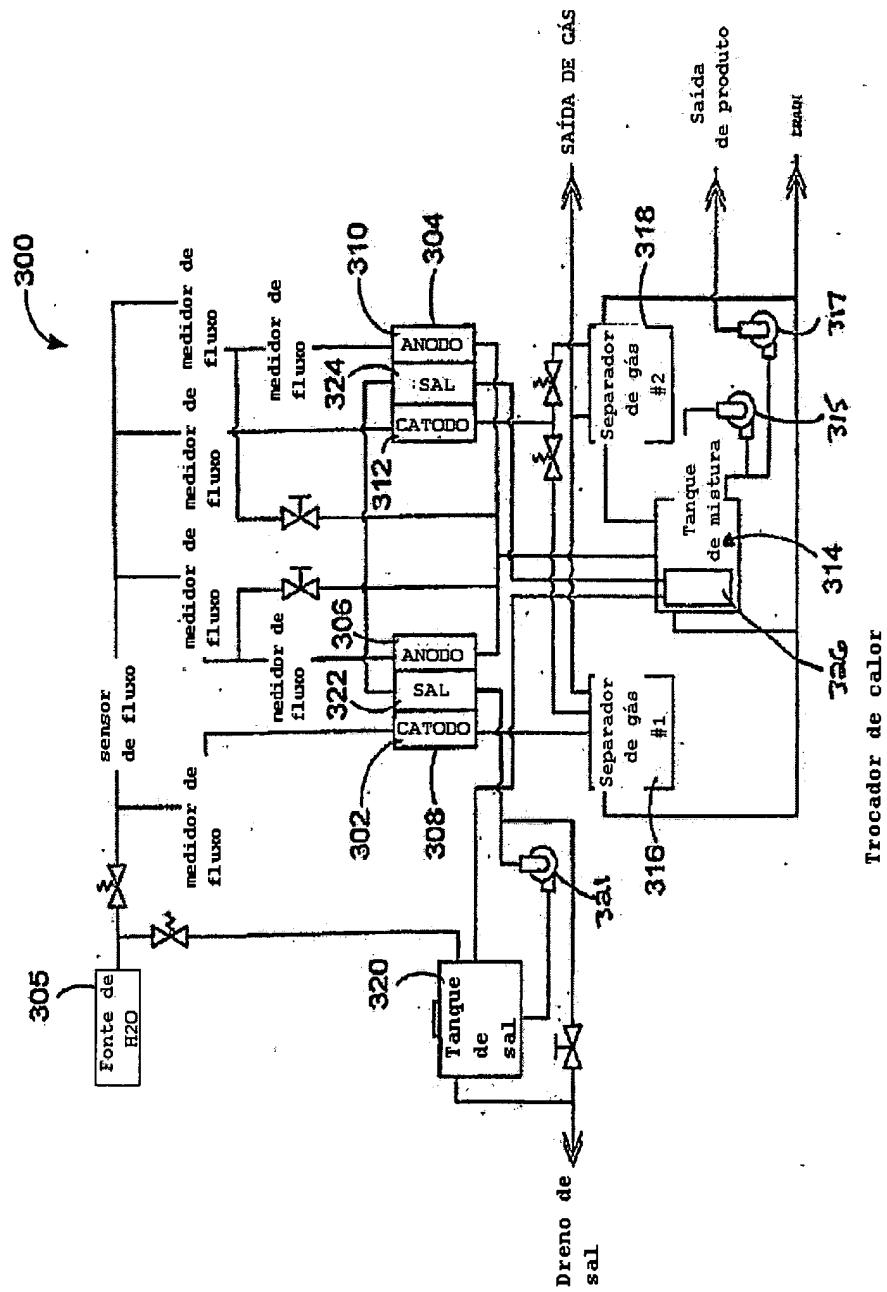
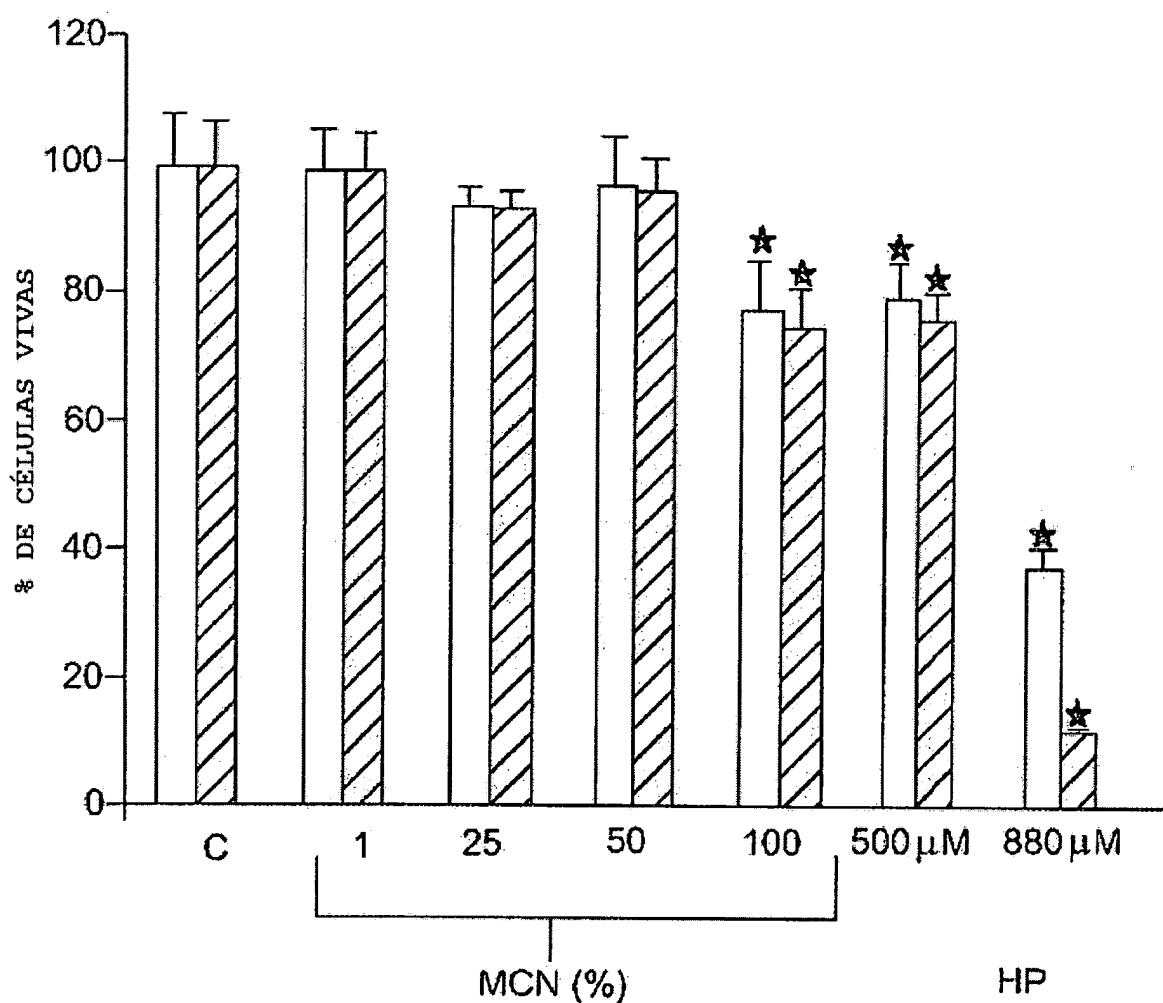
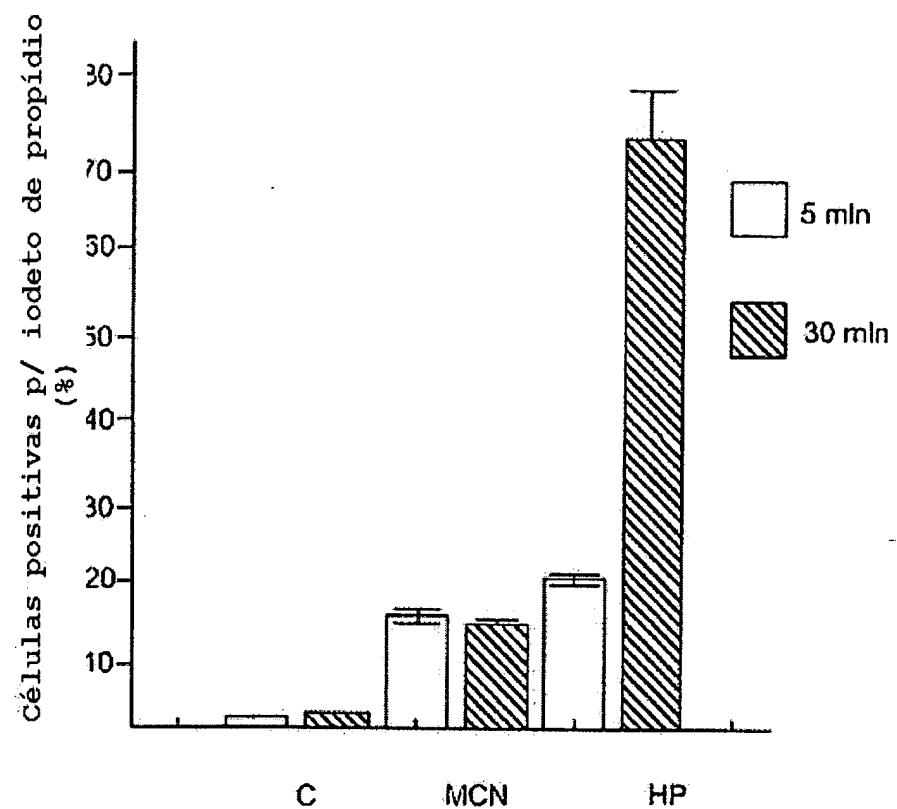
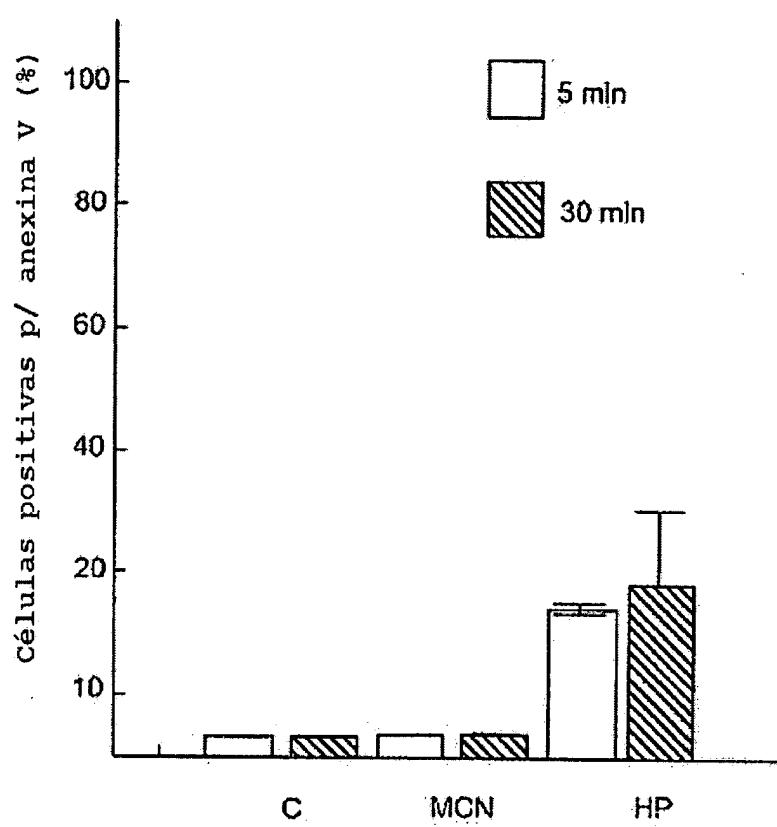


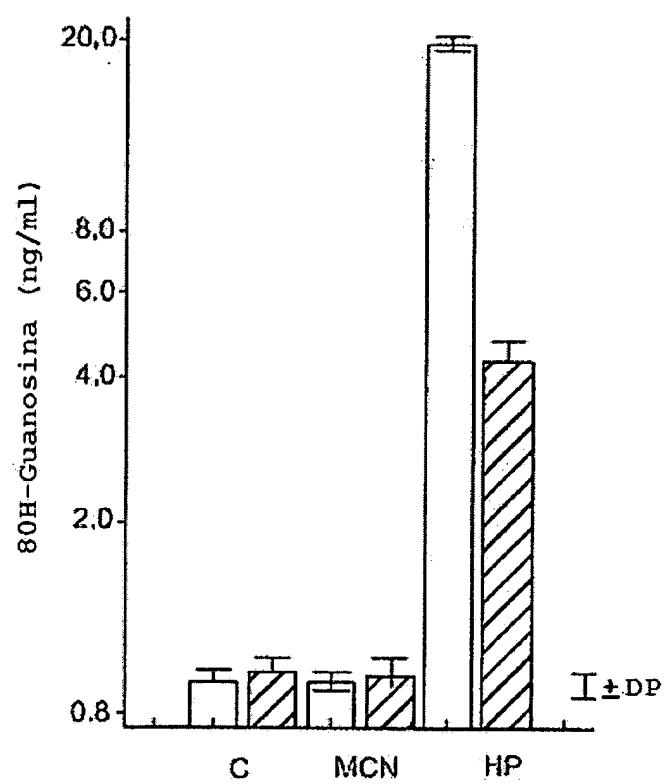
FIG. 3

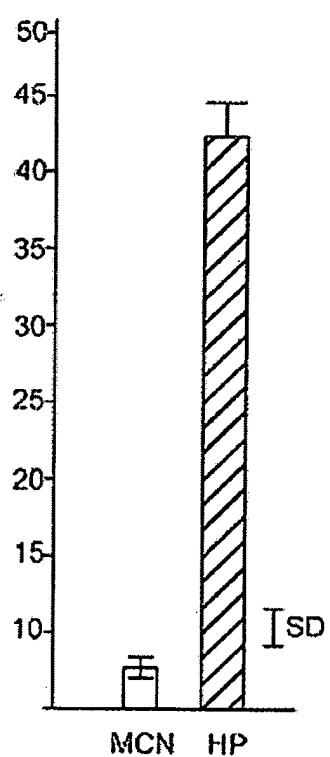


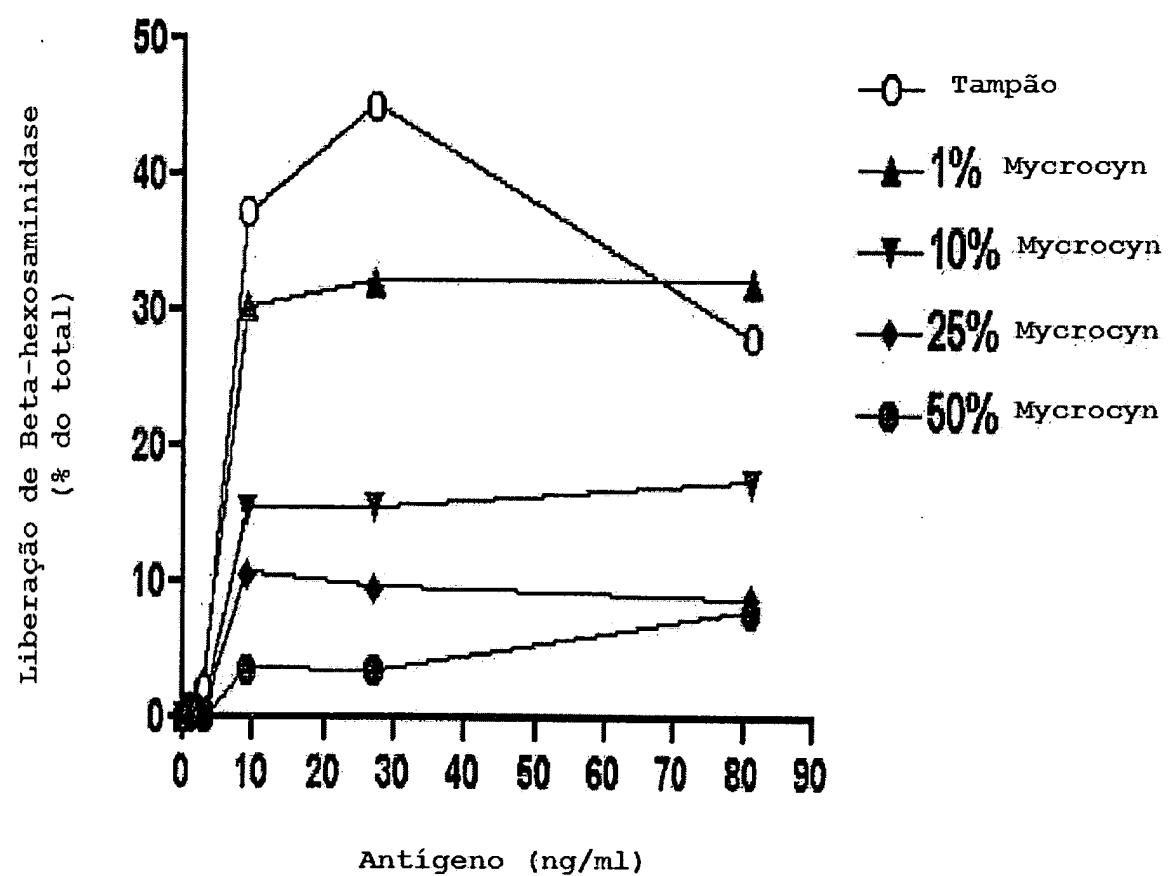
**FIG. 4A**

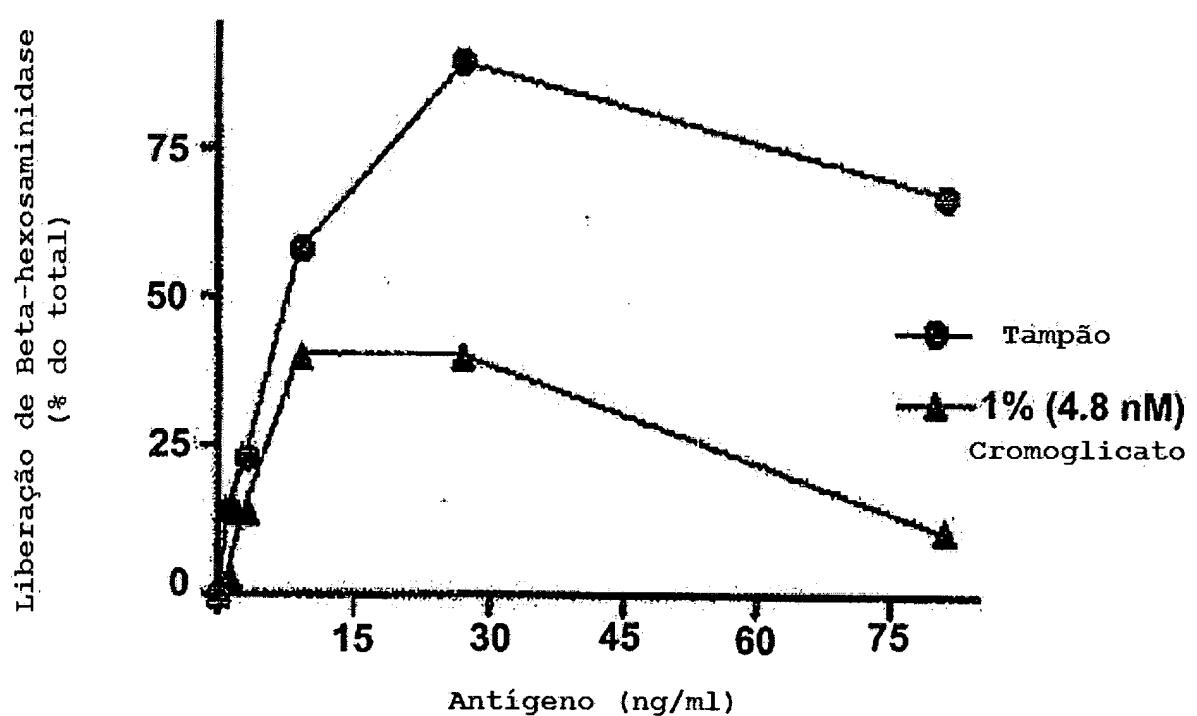
**FIG. 4B**

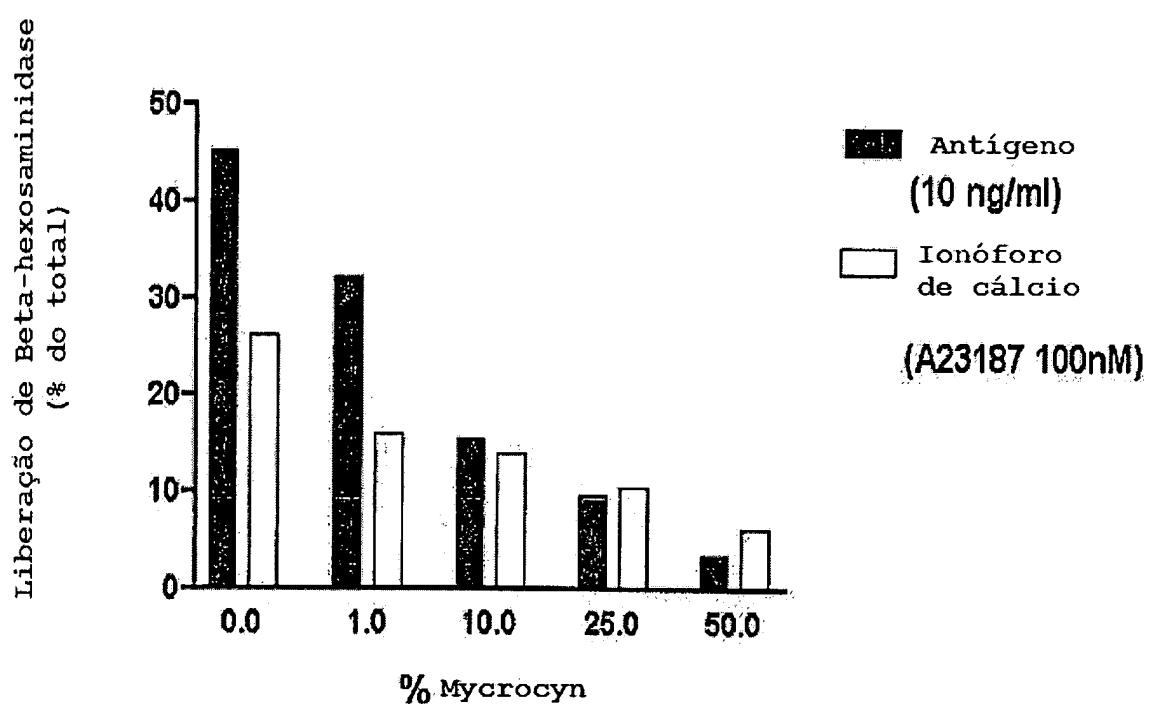
**FIG. 4C**

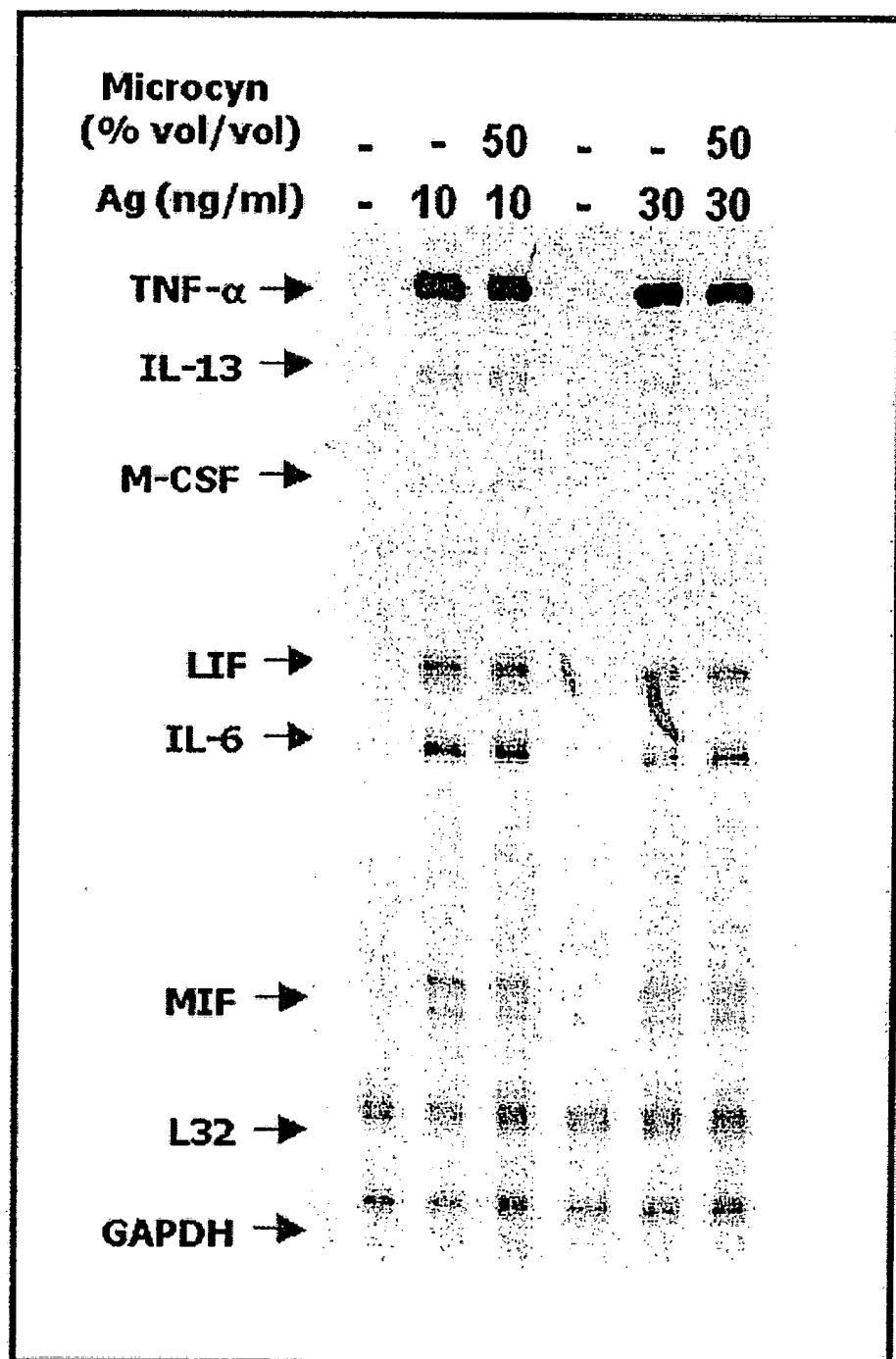
**FIG. 5**

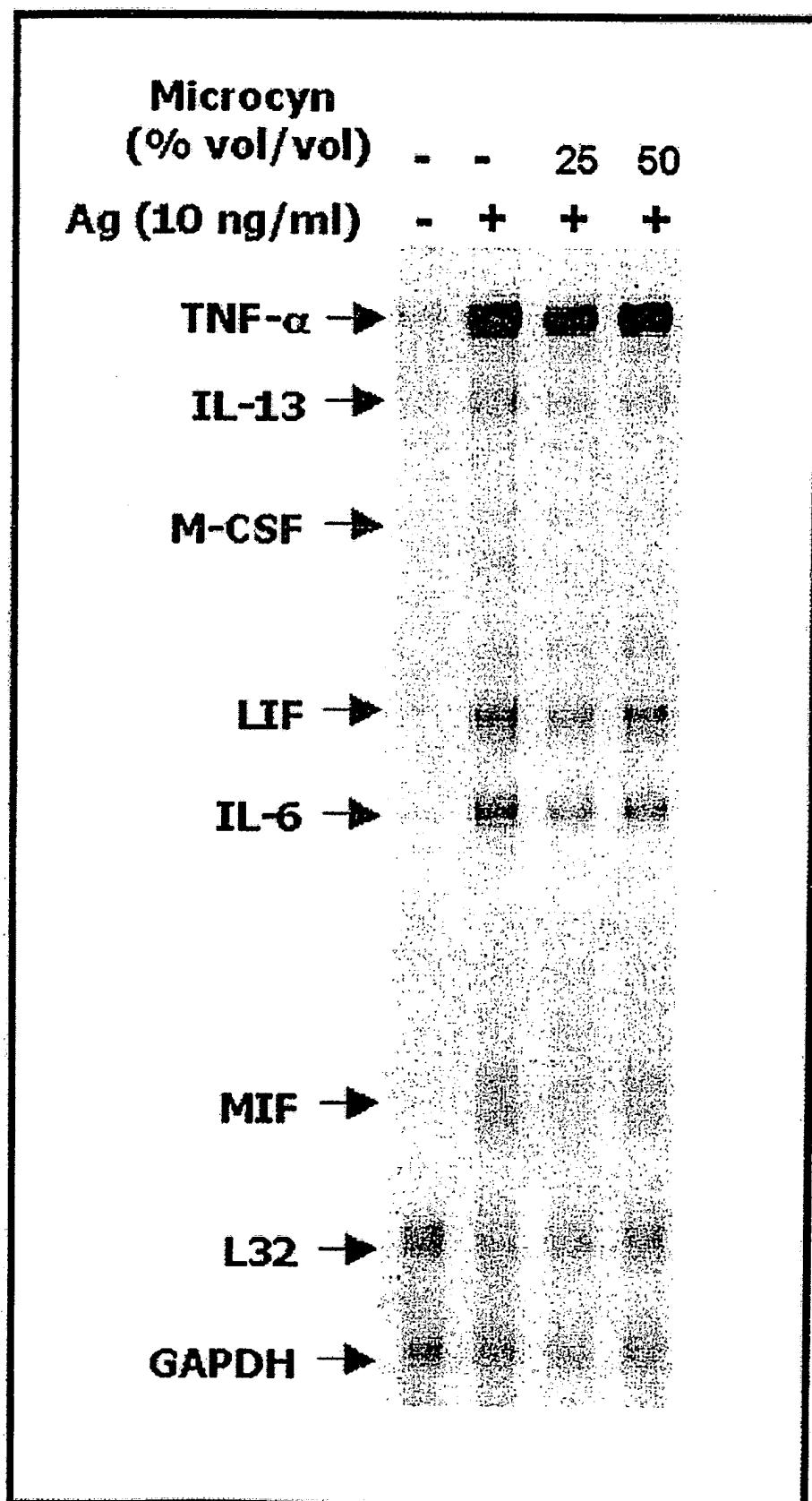
**FIG. 6**

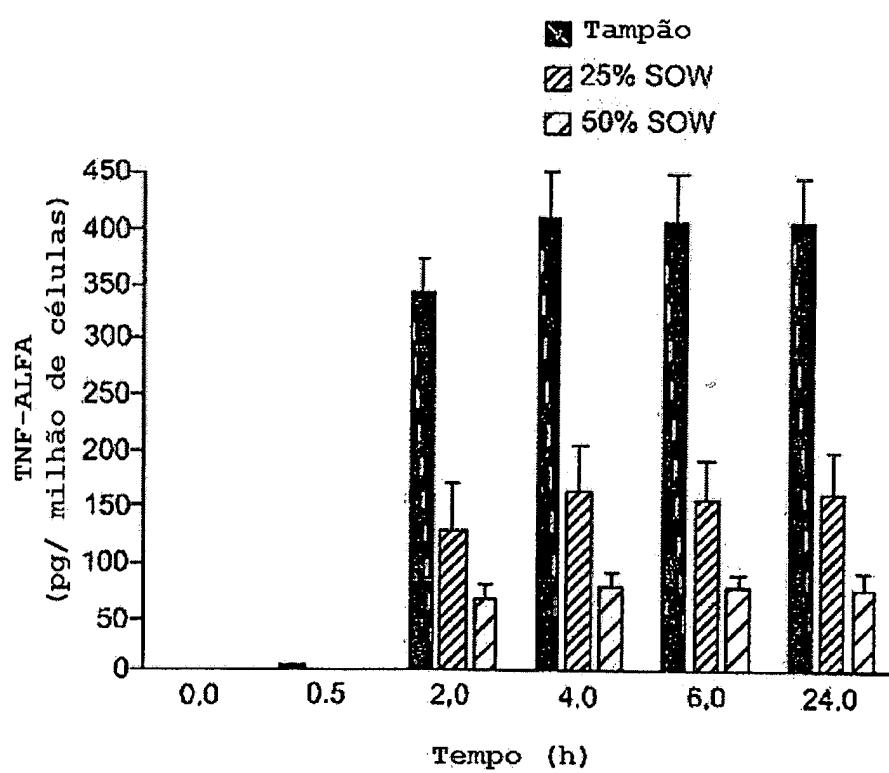
**FIG. 7**

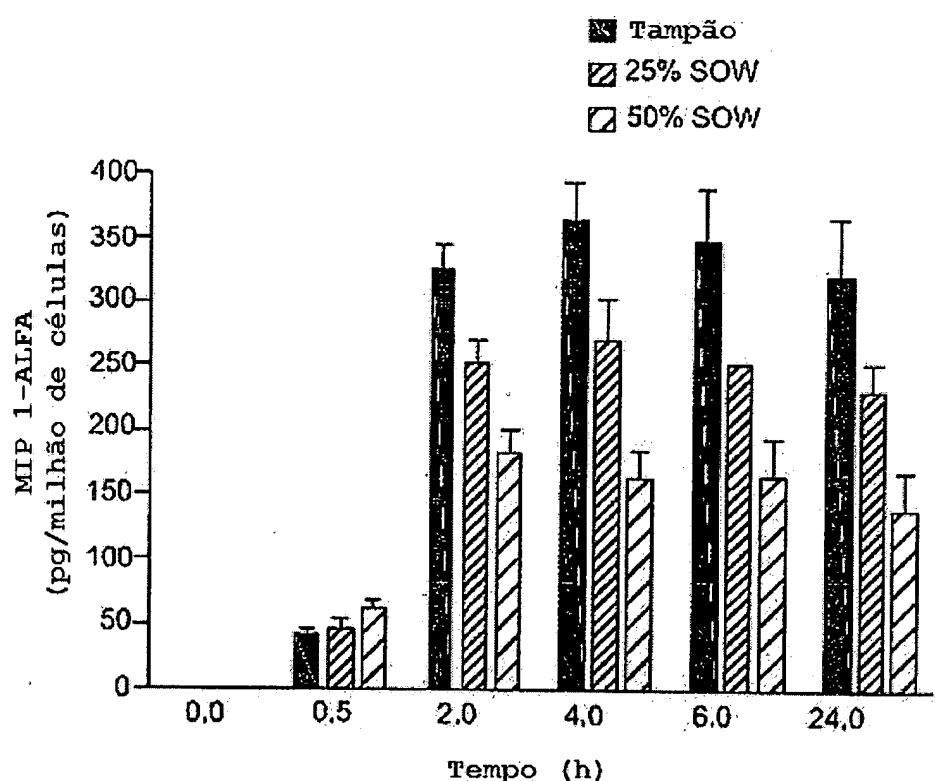
**FIG. 8**

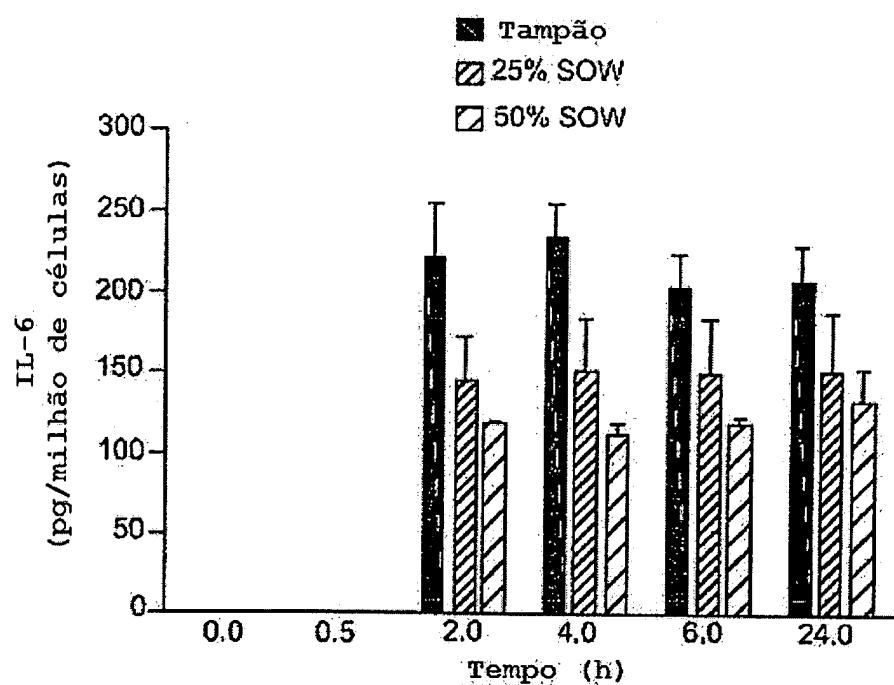
**FIG. 9**

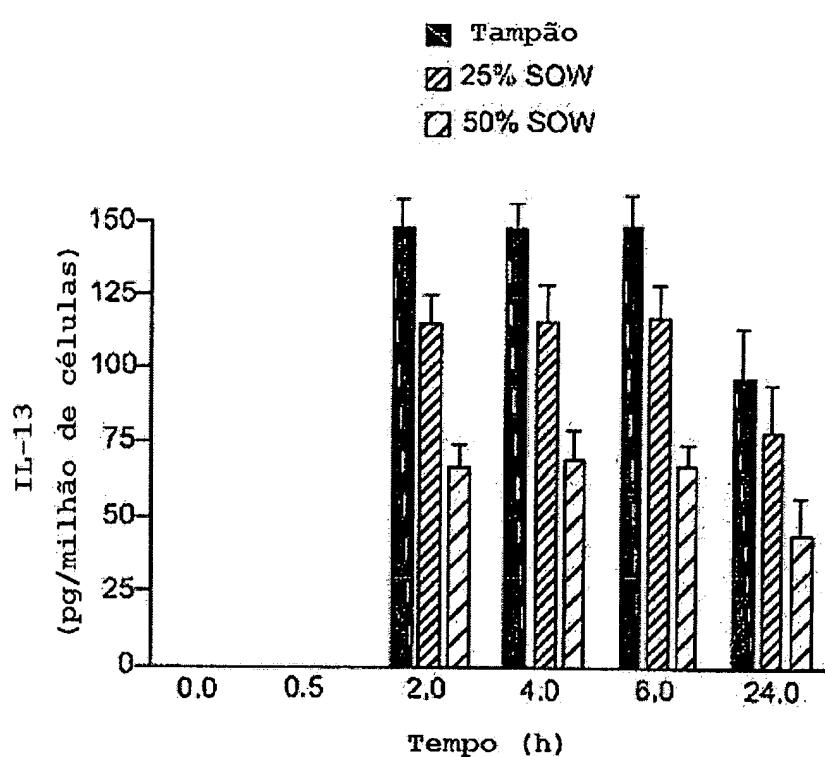
**FIG. 10A**

**FIG. 10B**

**FIG. 11**

**FIG. 12**

**FIG. 13**

**FIG. 14**

**MÉTODOS DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE SINUSITE COM SOLUÇÃO  
AQUOSA COM POTENCIAL DE OXIRREDUÇÃO**

É fornecido um método para prevenção ou tratamento de sinusite por administração de uma quantidade 5 terapeuticamente eficaz de uma solução aquosa com potencial de oxirredução (ORP) que é estável por pelo menos cerca de vinte e quatro horas. A solução aquosa com ORP administrada de acordo com a invenção pode ser combinada com um ou mais veículos adequados. A solução aquosa com ORP pode ser 10 administrada isoladamente ou, por exemplo, em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.