



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

(21) **PI0706996-0 A2**

(22) Data de Depósito: 15/02/2007  
(43) Data da Publicação: 12/04/2011  
(RPI 2101)



(51) *Int.Cl.:*  
A01N 63/00  
A01P 13/00

(54) Título: **MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO**

(30) Prioridade Unionista: 16/02/2006 US 11/355,589

(73) Titular(es): Buckman Laboratories Internacional ,INC

(72) Inventor(es): Deborah A. Marais, Graciela H. Vunk

(74) Procurador(es): Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) Pedido Internacional: PCT US2007004096 de 15/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/098032 de 30/08/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO. É provido um método para exterminar, prevenir ou inibir o crescimento de microorganismos num sistema aquoso ou num substrato capaz de suportar um crescimento de microorganismos, provendo-se lisozima, seja isoladamente ou em combinação com um composto de amônio quaternário ao sistema aquoso ou substrato.



PI0706996-0

"MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO".

Campo da invenção

5 A presente invenção refere-se a composições e métodos para controlar o crescimento de microorganismos em sistemas aquosos. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao tratamento de sistemas aquosos com lisozima isoladamente ou em combinação com compostos de amônio quaternário.

10 Histórico da invenção

Uma variedade de materiais vem sendo usada para controlar algas em diferentes ambientes, tais como, porém não restritos a: compostos à base de cloro/bromo, biguanidas, sais de cobre, compostos à base de prata, triazinas, 15 compostos de amônio quaternário e compostos poliméricos. Cada um deles apresenta deficiências relacionadas com sensibilidade ao pH e/ou à temperatura, estabilidade e/ou compatibilidade química, eficácia limitada, bem como toxicidade ambiental e/ou humana.

20 Por exemplo, o cloro é o sanitizante/desinfetante/oxidante mais amplamente utilizado por proprietários de piscinas. É muito eficaz para exterminar bactérias, algas e outros organismos vivos. O cloro é tipicamente adicionado a uma piscina na 25 forma líquida ou de tablete ou é provido por um gerador de cloro, que é um dispositivo contendo células elétricas que geram cloro de um banco de sal adicionado à água da piscina.

30 Porém, o cloro apresenta muitas desvantagens o que o torna pouco desejável para uso como desinfetante exclusivo em piscinas e em outros sistemas aquáticos recreativos. Por exemplo, o cloro pode se combinar com amônia para formar cloraminas, que são ineficazes como agentes sanitizantes, desinfetantes ou oxidantes. A 35 amônia está geralmente presente em água de piscinas e procede de fatores ambientais, formação de fertilizantes que são transportados pelo vento e depositados nas

piscinas, dejetos do nadador (perspiração, urina, saliva e óleos corporais) ou até mesmo loções bronzeadoras/protetores solares. Conseqüentemente, os supervisores de piscinas geralmente supercloram a piscina (> 3ppm) para compensar a transformação de cloro em cloraminas. A supercloração pode levar à absorção excessiva de cloro e cloraminas pela pele ou à inalação de ar ou vapor aquoso contendo cloro e cloraminas. Atletas que treinam por muitas horas numa piscina, especialmente em ambientes fechados, podem ficar particularmente suscetíveis à superexposição ao cloro e às cloraminas, e podem apresentar sintomas de hipersensibilidade e condições respiratórias semelhantes à asma.

Além disso, o cloro é inadequado para ambientes de aquicultura contendo plantas e animais desejáveis que podem ser prejudicados pelo cloro ou por seus subprodutos. Exemplos de tais ambientes incluem aquários, incubadoras de peixes, cativeiros de camarões, criadouros de camarões de água doce e similares.

A lisozima é conhecida como uma proteína antibacteriana potente, distribuída em diversos fluidos e tecidos biológicos, incluindo ovos de aves, plantas, bactérias e secreções animais. Está também presente em lágrimas, saliva, leite, secreções respiratórias e cervicais humanas, sendo secretada por leucócitos polimorfonucleares. Por suas propriedades antibacterianas, a lisozima vem sendo utilizada tanto nas indústrias farmacêuticas como nas alimentícias, sendo considerada muito segura para uso humano. De fato, a lisozima é um dos fatores antimicrobianos presentes no leite humano.

A patente americana No. 5.069.717 de Sherba et al. descreve composição microbicida para controlar mistura sinérgica de um difeniléter contendo algas e lisozima.

Conseqüentemente, é desejável ter um método para prevenir, exterminar e/ou inibir o crescimento de

microorganismos que seja barato e que utilize um ingrediente eficaz à baixa concentração e facilmente encontrado.

É também desejável ter um método para prevenir, exterminar, e/ou inibir o crescimento de microorganismos que não utilize cloro ou outros ingredientes indesejáveis do ponto de vista ambiental.

#### Sumário da invenção

Recentemente, descobriu-se que uma composição antimicrobiana potente para controlar o crescimento de microorganismos, especialmente de algas, em sistemas aquosos pode ser obtida provendo-se lisozima, seja isoladamente ou em combinação com pelo menos um composto quaternário, ao sistema aquoso. A presente invenção pode ser aplicada numa variedade de sistemas e processos de fluidos industriais (ex: sistemas aquosos), inclusive, porém não restritos a, sistemas aquosos para fabricação de papel, pastas de polpa, água branca em processos de fabricação de papel, sistemas de água de refrigeração (torres de resfriamento, água de refrigeração de admissão e água de refrigeração de efluentes), sistemas de águas servidas, sistemas de água recirculante, banheiras de hidromassagem, piscinas, sistemas aquáticos recreativos, sistemas de processamento de alimentos, sistemas de água potável, sistemas aquosos para processamento de couro, fluidos de usinagem e outros sistemas aquosos industriais.

Em uma concretização da presente invenção, a lisozima pode ser adicionada a um sistema de água salina, tal como, porém não exclusivamente, a sistema aquoso utilizando um sistema de cloração salino. A lisozima pode opcionalmente atuar sinergicamente com cloreto de sódio para prover uma composição para controlar o crescimento de microorganismos, especialmente, por exemplo, algas.

As características e vantagens adicionais da presente invenção serão estabelecidas em parte na descrição a seguir, e, em parte, serão evidentes com base na

descrição, ou podem ser aprendidas pela prática da presente invenção. Os objetivos e outras vantagens da presente invenção serão concretizados e atingidos por meio dos elementos e combinações especialmente indicados na descrição e nas reivindicações em anexo.

Fica entendido que tanto a descrição geral anteriormente citada como a descrição detalhada a seguir são apenas para fins de exemplo e não restritivas da presente invenção, conforme reivindicado. Todas as patentes, pedidos de patente, e publicações mencionados acima e em todo o relatório da presente invenção são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência.

#### Descrição detalhada da presente invenção

A presente invenção provê métodos e composições para controlar o crescimento de microorganismos em sistemas aquosos usando lizosima, isoladamente ou em combinação com pelo menos um composto de amônio quaternário.

De acordo com os métodos da presente invenção, controlar ou inibir o crescimento de pelo menos um microorganismo inclui a redução e/ou a prevenção de tal crescimento.

Conforme aqui utilizado, o termo "sistema aquoso" inclui sistemas aquáticos recreativos, especialmente sistemas aquáticos recirculantes tais como banheiras de hidromassagem, balneários e piscinas, bem como sistemas de fluidos industriais, inclusive, porém não restritos a sistemas aquosos para fabricação de papel, pastas de polpa, água branca em processos de fabricação de papel, sistemas de água de refrigeração (torres de resfriamento, água de refrigeração de admissão e água de refrigeração de efluentes), sistemas de águas servidas, sistemas de processamento de alimentos, sistemas de água potável, sistemas aquosos para processamento de couro, fluidos de usinagem e outros sistemas aquosos industriais.

A presente invenção é especialmente apropriada para sistemas aquosos que entram em contato com organismos superiores, que não são danificados pela lizosima devido à sua baixa toxicidade. Portanto, a presente invenção

pode ser usada, por exemplo, para controlar microorganismos, como por exemplo, algas, em piscinas, balneários e banheiras de hidromassagem e para controlar algas em sistemas aquosos utilizados em aquacultura, inclusive incubadoras de peixes, fazendas criadoras de peixes, cativeiros de camarões, criadouros de camarões de água doce, moluscos e similares.

Como exemplo, a lisozima pode ser adicionada a um sistema de água salina, tal como um sistema aquoso utilizando um sistema de cloração salino. Por exemplo, o sistema aquoso pode conter de cerca de 2.000 ppm a cerca de 8.000 ppm, tal como de 2.800 ppm a 6.000 ppm de cloreto de sódio. A lisozima pode opcionalmente atuar sinergicamente com cloreto de sódio para prover uma composição que controle o crescimento de microorganismos, particularmente de algas. Devido à atividade da lisozima no controle de algas e/ou de outros microorganismos, pode haver uma necessidade reduzida de acionar o gerador de cloro em tal sistema aquoso, reduzindo assim os gastos com eletricidade e a probabilidade de efeitos indesejáveis decorrentes da supercloração.

A lisozima pode também ser adicionada para controlar algas e outros microorganismos em sistemas aquosos que foram tratados para redução ou remoção de cloro. Por exemplo, os aquários podem conter espécies vegetais e animais sensíveis ao cloro, mesmo nas quantidades presentes nas fontes distribuidoras de água municipais, de forma que a água neles utilizada deve ser filtrada ou tratada para a remoção do cloro. A lisozima pode então suprir pelo menos parte da atividade de controle de microorganismos que se perde devido à redução ou remoção de cloro.

Deve também ficar entendido que ao "controlar" (ex: prevenir) o crescimento de pelo menos um microorganismo, o crescimento do microorganismo fica pelo menos parcialmente inibido. Em outras palavras, não há crescimento ou essencialmente nenhum crescimento do

microorganismo. "Controlar" o crescimento de pelo menos um microorganismo mantém a população de microorganismos num nível desejado, reduz a população até um nível desejado (mesmo em limites indetectáveis) e/ou pelo menos  
5 parcialmente inibe o crescimento do microorganismo. Assim, em uma concretização da presente invenção, os produtos, material, ou meios suscetíveis a ataque de pelo menos um microorganismo são pelo menos parcialmente preservados desse ataque e do estrago resultante, bem  
10 como de outros efeitos prejudiciais causados pelo microorganismo. Além disso, deve também ficar entendido que "controlar" o crescimento de pelo menos um microorganismo também inclui reduzir bioestaticamente e/ou manter um nível baixo de pelo menos um  
15 microorganismo, de forma que o ataque pelo microorganismo e qualquer estrago resultante ou outros efeitos prejudiciais sejam mitigados, ou seja, a taxa de crescimento ou de ataque do microorganismos é reduzida e/ou eliminada. As composições da presente invenção  
20 possuem preferivelmente baixa toxicidade. Exemplos desses microorganismos incluem fungos, bactérias, algas e suas misturas, tais como, porém não restritos a, por exemplo, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* e *Chlorella sp.* Um outro exemplo é um microorganismo  
25 gram-positivo, como a espécie *Bacillus*. A lisozima é tipicamente designada na nomenclatura das enzimas como "EC 3.2.1.17" sendo também comumente denominada muramidase. A lisozima utilizada na presente invenção pode proceder de qualquer fonte conhecida de  
30 lisozima, tal como de qualquer fonte vegetal ou animal, podendo ser obtida através de qualquer método de produção, isolamento, ou purificação de enzima, incluindo meios recombinantes. A lisozima está disponível no mercado na forma purificada em escala industrial.  
35 Tipicamente, a enzima purificada é apresentada na forma de um sólido branco. Como opção, a lisozima pode ser uma lisozima tratada

termicamente ou uma lisozima modificada termicamente. A lisozima pode ser um dímero de lisozima. A lisozima pode ser termicamente modificada, por exemplo, aquecendo-se a lisozima a uma temperatura elevada, tal como o aquecimento em banho maria. A temperatura pode ser qualquer temperatura suficiente para modificar a lisozima, por exemplo, para formar um dímero de lisozima. Por exemplo, pode-se utilizar uma temperatura de cerca de 50°C ou mais alta, tal como 70°C a 100°C, mais particularmente, uma temperatura de 80°C por cerca de 20 minutos. Para fins da presente invenção, mais de um tipo de lisozima pode estar presente. Por exemplo, uma lisozima não modificada pode estar presente com uma lisozima termicamente modificada. Além disso, o dímero de lisozima pode ter outras lisozimas presentes. Por exemplo, a lisozima da presente invenção pode ter 5% de dímero de lisozima presente a 50% dímero de lisozima presente ou mais. Por exemplo, o dímero de lisozima pode estar presente numa quantidade de 1% a 50% ou de 10% a 35%. A lisozima termicamente tratada ou termicamente modificada pode atuar como desnaturação térmica parcial ou completa da lisozima. Conforme citado, qualquer combinação de lisozimas pode ser usada na presente invenção.

Conforme aqui descrito, a adição opcional ou a presença de pelo menos um composto de amônio quaternário também aumenta a atividade antimicrobiana quando utilizado com a lisozima e particularmente intensifica a atividade antialgal. Por exemplo, os compostos de amônio quaternário, tal como o cloreto de alquil dimetil benzil amônio estão disponíveis no mercado como algicidas. O uso de um composto de amônio quaternário pode prover um espectro mais amplo de atividade antialgal ou pode proporcionar aumento na eficácia contra algas problemáticas. Em particular, acredita-se que a lisozima e um composto de amônio quaternário atuam sinergicamente para prover um sistema antimicrobiano especificamente

útil e econômico.

O composto de amônio quaternário que pode ser usado para prover efeitos antimicrobianos sinérgicos adicionais de acordo com a presente invenção pode ser obtido de qualquer fonte de amônio. Por exemplo, o composto de amônio quaternário pode ser um composto com um único grupo amônio quaternário ou um composto de amônio poliquaternário. Exemplos de compostos de amônio quaternário apropriados incluem, por exemplo, cloreto de N,N-dietil-N-dodecil-N-benzilamônio, cloreto de N,N-dimetil-N-octadecil-N-(dimetilbenzil)amônio, cloreto de N,N-dimetil-N,N-dodecilamônio, cloreto de N,N-dimetil-N,N-didodecilamônio, cloreto de N,N,N-trimetil-N-tetradecilamônio, cloreto de N-benzil-N,N-dimetil-N-(alquil C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>) amônio, cloreto de N-(diclorobenzil)-N,N-dimetil-N-dodecilamônio, cloreto de N-hexadecilpiridínio, brometo de N-hexadecilpiridínio, brometo de N-hexadecil-N,N,N-trimetilamônio, cloreto de N-dodecilpiridínio, bissulfato de N-dodecilpiridínio, cloreto de N-benzil-N-dodecil-N,N-bis(beta-hidroxi-etil)amônio, cloreto de N-dodecil-N-benzil-N,N-dimetilamônio, cloreto de N-benzil-N,N-dimetil-N-(alquil C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)amônio, etilssulfato de N-dodecil-N,N-dimetil-N-etilamônio, cloreto de N-dodecil-N,N-dimetil-N-(1-naftilmetil)amônio, cloreto de N-hexadecil-N,N-dimetil-N-benzilamônio ou cloreto de N-dodecil-N,N-dimetil-N-benzilamônio. O composto de amônio quaternário pode também ser um composto de amônio poliquaternário. Os compostos de amônio quaternário antimicrobianos que podem ser usados incluem os descritos nas patentes americanas NoOs. 3.874.870, 3.931.319, 4.027.020, 4.089.977, 4.111.679, 4.506.081, 4.581.058, 4.778.813, 4.970.211, 5.051.124, 5.093.078, 5.142.002 e 5.128.100, que são aqui incorporadas por referência. Um exemplo de um composto de amônio poliquaternário é o dicloreto de poli(oxietileno-(dimetilimínio)etileno (dimetilimínio)etileno) que é comercializado sob a marca WSCP da Buckman Laboratories

International, Inc.

Como método para exterminar, prevenir ou inibir o crescimento de microorganismos, a liozima e, opcionalmente, o composto de amônio quaternário, podem ser providos ao sistema aquoso sob condições em que a liozima e o composto de amônio quaternário atuem para prover um agente antimicrobiano que extermine, previna ou iniba o crescimento de microorganismos no sistema aquoso. Um habilitado na técnica poderá imediatamente determinar a quantidade eficaz de liozima e de composto de amônio quaternário opcional útil para uma aplicação específica, simplesmente testando diversas concentrações antes do tratamento de um sistema afetado completo. Por exemplo, num sistema aquoso a ser tratado, a concentração de liozima pode ser qualquer quantidade eficaz, tal de cerca de 0,01 ppm a 5.000 ppm, e no tratamento de algas, uma faixa preferida é de cerca de 0,01 ppm a cerca de 2.000 ppm, sendo preferivelmente numa faixa de cerca de 0,1 a cerca de 500 ppm.

O composto de amônio quaternário pode estar presente no sistema aquoso em qualquer quantidade eficaz, tal como numa faixa de 0,01 ppm a cerca de 1.000 ppm e preferivelmente na faixa de cerca de 0,1 ppm a cerca de 100 ppm.

As concentrações de liozima e de composto de amônio quaternário, conforme acima descrito ou conforme descrito em outro lugar do presente pedido, podem ser as concentrações iniciais dos componentes no momento em que os componentes são combinados ou adicionados a um sistema aquoso e/ou podem ser as concentrações dos componentes a qualquer momento após os componentes terem interagido com o sistema aquoso.

Se tanto a liozima como pelo menos um composto de amônio quaternário forem utilizados no método da presente invenção, os ingredientes podem ser adicionados separadamente a um sistema aquoso ou podem ser combinados para formar uma composição que é adicionada ao sistema

aquoso. Se forem adicionados separadamente, a ordem de adição de componente não é crítica, podendo ser usada qualquer ordem.

O método da presente invenção pode ser praticado em qualquer pH, tal como uma faixa de pH de cerca de 2 a cerca de 11, com uma faixa de pH preferida de cerca de 5 a cerca de 9. Para um sistema aquoso que entrará em contato com organismos superiores, tais como humanos ou peixes, o pH deve ser neutro (em torno de 7). O pH do sistema aquoso pode ser ajustado adicionando-se um ácido(s) ou uma base(s) conforme é conhecido no estado da técnica. O ácido ou base adicionado deve ser selecionado para não reagir com nenhum dos componentes do sistema. Porém, é preferível adicionar a lisozima e o composto de amônio quaternário opcional à água sem ajuste de pH.

O método da presente invenção pode ser usado em quaisquer sistemas aquosos industriais ou recreativos que demandem controle de microorganismos. Tais sistemas aquosos incluem, porém não se restringem a fluidos de usinagem, sistemas de água de refrigeração (torres de resfriamento, água de refrigeração de admissão e água de refrigeração de efluentes), sistemas de águas servidas, inclusive águas residuárias ou sistemas de saneamento submetidos ao tratamento de resíduos presentes na água, como por exemplo, tratamento de esgotos, sistemas de água recirculante, piscinas, banheiras de hidromassagem, sistemas de processamento de alimentos, sistemas de água potável, sistemas aquosos para processamento de couro, sistemas de água branca, pastas de polpa, e outros sistemas aquosos para processamento e fabricação de papel. Em geral, qualquer sistema aquoso industrial ou recreativo pode-se beneficiar da presente invenção. O método da presente invenção pode também ser usado no tratamento de água de admissão para diversos processos industriais ou instalações recreativas. A água de admissão pode ser primeiramente tratada através do método da presente invenção, para que o crescimento microbiano

seja inibido antes que a água de admissão ingresse no processo industrial ou na instalação recreativa.

A presente invenção será também esclarecida pelos exemplos a seguir, que pretendem ilustrar a presente  
5 invenção.

#### EXEMPLOS

##### Procedimentos Gerais

##### A. Avaliação de Atividade Algicida

Esse método de teste provê uma técnica para testar  
10 compostos quanto à sua eficácia para inibir (reprimir) o crescimento de algas. Os valores MIC representam a Concentração Inibitória Mínima, definida como o nível mais baixo de composto necessário para inibir completamente (reprimir) o crescimento de um dado  
15 organismo.

##### Aparelho:

Tubos de ensaio, 18 - 150 mm. São necessários tubos de ensaio esterilizados.

Incubadora, capaz de uma temperatura constante ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) e  
20 regulagem de luz.

##### Reagentes e Materiais:

$\text{KNO}_3$

$\text{K}_2\text{HPO}_4$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

25 Citrato de ferro amoniacal (solução a 1%).

##### Soluções concentradas:

Componente de solução concentrada	g/200g de água deionizada
A. $\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,50
B. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,50
C. $\text{Na}_2\text{CO}_3$	0,80
D. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,50
E. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1,16
F. Ácido cítrico	1,20
G. Metais PIV	

Na <sub>2</sub> EDTA	0,750 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,097 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,041 g
ZnCl <sub>2</sub>	0,005 g
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,002 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,004 g
Água deionizada	1.000.000 ml

Inóculo.

Suspensão de células de uma cultura crescida em meio Allen modificado por 14 dias ou conforme necessário para  
 5 obter um massa celular desejada de *Chlorella sp.* (ATCC 7516) ou *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). O inóculo é calibrado a uma transmitância de 82% medida a um comprimento de onda de 590 nanômetros antes da inoculação.

10 Procedimento:

Preparação do Meio:

Meio de Allen Modificado (Allen, A.A., 1968)

NaNO <sub>3</sub>	1,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0 ml sol.conc.A.
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0 ml sol.conc.B.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5,0 ml sol.conc.C.
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10,0 ml sol.conc.D.
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	10,0 ml sol.conc.E.
Ácido cítrico	1,0 ml sol.conc.F.
Metal PIV	1,0 ml sol.conc.G.
Água deionizada	1000.0 ml

15 Esterilizar o meio na autoclave durante 20 minutos a uma pressão de 15 libras (121°C). Após autoclavagem, resfriar o meio até 45-50°C e dispensar 5 ml de meio por tubo de ensaio, e então adicionar o composto e o inóculo.

Incorporação de Composto:

Preparar uma solução concentrada em água do composto a ser testado. A concentração da solução concentrada é  
 20 dependente da maior dosagem desejada a ser testada. Diluir a solução concentrada para obter dosagens menores do que as selecionadas para a solução concentrada. Uma quantidade máxima de 100 microlitros de solução concentrada ou a diluição correspondente deve ser

adicionada por tubo de ensaio.

Inoculação:

Adicionar 100 microlitros de inóculo por tubo de ensaio, por tipo de meio e por tipo de inoculação.

5 Incubação:

Colocar os tubos de ensaio contendo os tratamentos numa incubadora ajustada para 24°C. A luz é fornecida através de lâmpadas fluorescentes para o cultivo de plantas ajustadas para fornecer 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

10

Classificação dos Tubos:

Os tubos de ensaio contendo os tratamentos são classificados como positivos ou negativos:

. Positivos (contaminados) quando o meio presente nos tubos mostrar crescimento de algas (depósito verde no fundo).

15

. Negativos (não contaminados) quando o meio presente nos tubos permanecer incolor.

O controle é sempre positivo. A concentração inibitória mínima (MIC) do composto é a menor dosagem mostrando o crescimento negativo de algas.

20

Avaliação de Sinergia:

A sinergia foi medida através de diluições segundo o método "checkerboard" (hibridização de DNA) (Yan e Hancock, 2001) no qual um composto é diluído ao longo das carreiras de tubos de ensaio e o outro é diluído ao longo das colunas. Esse método é focado sobre a busca por uma redução no MIC de cada componente na presença do outro. O resultado é expressado como Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC), calculado conforme segue:

30

$$FIC = [A]/MIC_A + [B]/MIC_B, \text{ onde}$$

$MIC_A$  e  $MIC_B$  = MICs dos compostos A e B isoladamente

[A] e [B] = MICS dos compostos A e B em combinação

Um índice FIC < 1 indica sinergia; um índice de 0,5 representa o equivalente de uma redução quádrupla no MIC de cada composto em combinação. Um índice FIC de 1,0 representa atividade aditiva (uma redução dupla no MIC de

35

cada composto em combinação) e um índice > 1 indica antagonismo; um índice > 4 representa o antagonismo real.

#### B. Avaliação de Atividade Bactericida

Esse método é apropriado para uso na avaliação das propriedades antibacterianas de agentes químicos, através da determinação de seu valor MIC. O valor MIC representa a Concentração Inibitória Mínima definida como o nível mais baixo de composto necessário para se obter  $\geq 90\%$  extermínio de um dado organismo.

#### 10 Equipamento:

- . Tubos de ensaio, tubos para cultura descartáveis 18x150mm - estéreis
- 2. Pipetas estéreis de 1 ml e de 10 ml
- 3. Incubadora capaz de manter uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 15 4. Autoclave
- 5. Aparelho medidor de pH
- 6. Pontas para micropipeta 1-200 ul
- 7. Micropipeta Eppendorf
- 8. McFarland Padrão #1
- 20 9. Placas de Petri: placas de Petri plásticas, descartáveis, tamanho: 100 x 15 mm
- 3. Preparação dos Meios
- 1. Placa com Ágar Padrão para Contagem Difco: reidratar o ágar suspendendo 23,5 g em 1-L de água deionizada e aquecer até o ponto de fervura para dissolver. Dispensar conforme desejado e esterilizar numa autoclave a vapor por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .
- 25 2. Substrato de Sais Basais, pH 7:
- Trizma<sup>®</sup> (Tris) HCl..... 3,9 g
- 30 Trizma<sup>®</sup> (Tris) Base..... 0,05 g
- (Nota: Obter o pH apropriado antes da adição do composto seguinte. Ajustar com mais de qualquer um dos tampões Trizma<sup>®</sup> apropriado).
- Glicose..... 0,02 grama
- 35 Peptona..... 0,01 grama
- Nitrato de amônio..... 1,0 grama
- Sulfato magnésio, heptahidrato. 0,25 grama

Cloreto de cálcio..... 0,25 grama

Autoclave a 121°C por 15 min... 0,25 grama

#### C. Inóculo

Suspensão de células de uma cultura bacteriana de 18 a 24  
5 h de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ou de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ou de *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) para se obter uma concentração desejada de células. Utilizando um padrão de sulfato de bário em nefelômetro McFarland ou algum outro método apropriado,  
10 ajustar a concentração da suspensão bacteriana de forma a se obter uma concentração final de entre  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células por ml, quando 100  $\mu$ l do inóculo são adicionados a 5 ml do substrato de sais basais.

#### D. Incorporação de Composto

15 Preparar uma solução concentrada em água do composto a ser testado. A concentração da solução concentrada é dependente da maior dosagem desejada a ser testada. Diluir a solução concentrada para se obter dosagens menores do que as selecionadas para a solução  
20 concentrada. Uma quantidade máxima de 100  $\mu$ l de solução concentrada ou a diluição correspondente deve ser adicionada por tubo de ensaio.

#### E. Inoculação e Incubação

Adicionar 100  $\mu$ l de inóculo por tubo de ensaio por tipo  
25 de meio e tipo de inóculo, e incubar a 37°C por 18 horas.

#### F. Classificação dos tubos através do método de contagem de placas.

O ágar para Contagem Padrão em Placas/Plaqueamento para  
incorporação em ágar ("Pour Plate") foi preparado  
30 conforme descrito em *Standard Methods* (American Public Health Association; 1995). Um milímetro da amostra foi colocado no centro de uma placa de Petri estéril (diâmetro de 100 mm) utilizando uma pipeta estéril. O ágar para contagem padrão em placas derretido (44 a 46°C)  
35 e estéril foi adicionado e misturado com a amostra girando-se a placa. As amostras forem deixadas esfriar à temperatura ambiente até se tornarem sólidas e então

foram invertidas e incubadas a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante  $48 \pm 2\text{h}$ . As colônias formadas no ou sobre o meio de contagem de placa no prazo de  $48 \pm 2\text{h}$  foram contadas conforme descrito em *Standard Methods*, e os resultados foram  
 5 relatados como CFU/milímetro. Quando aplicável, esse valor foi multiplicado pelo fator de diluição para se obter o CFU/milímetro corrigido.

Nesse teste, o MIC do composto é a concentração que produziu 90% de extermínio. Foi calculado utilizando a  
 10 seguinte equação:

$$\frac{\text{CFU médio/ml em controles} - \text{CFU médio/ml no tratamento} \times 100}{\text{CFU médio/ml em controles}}$$

#### G. Avaliação da Sinergia

A sinergia foi medida através de diluições segundo o  
 15 método "checkerboard" (hibridização de DNA) (Yan e Hancock, 2001) no qual um composto é diluído ao longo das carreiras de tubos de ensaio e o outro é diluído ao longo das colunas. Esse método é focado sobre a busca por uma redução no MIC de cada componente na presença do outro. O  
 20 resultado é expressado como Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC), calculado conforme segue:

$$\text{FIC} = [\text{A}]/\text{MIC}_\text{A} + [\text{B}]/\text{MIC}_\text{B}, \text{ onde}$$

$\text{MIC}_\text{A}$  e  $\text{MIC}_\text{B}$  = MICs dos compostos A e B isoladamente

[A] e [B] = MICS dos compostos A e B quando em combinação

25 Um índice  $\text{FIC} < 1$  indica sinergia; um índice de 0,5 representa o equivalente de uma redução quádrupla no MIC de cada composto em combinação. Um índice  $\text{FIC}$  de 1,0 representa atividade aditiva (uma redução dupla no MIC de cada composto em combinação) e um índice  $> 1$  indica  
 30 antagonismo; um índice  $> 4$  representa o antagonismo real. *Este é um sistema puramente enzimático para controlar algas. Lisozima é preferivelmente usada por si só como ingrediente ativo nesta invenção.*

. Lisozima (Sigma), Cloreto de Lysozima (NutriScience),  
 35 Cloreto de Lisozima (MP Biomedicals) foram testados contra *Chlorella* sp. (ATCC 7516). O período de incubação foi de 14 dias a  $24^{\circ}\text{C}$  sob 16 horas de luz e 8 horas de

penumbra

Enzima	MIC (ppm roduto)
Liozima (Sigma)	0,4 - 0,7
Cloreto de liozima (NutriScience)	0,4 - 0,7
Cloreto de liozima (MP Biomedicals)	0,1 - 0,4

A liozima pode também ser aplicada em combinação com compostos de amônio quaternário comumente utilizados no sistemas de tratamento de água e sistemas aquáticos recreativos (ex:produto BUSAN 77<sup>TM</sup>) para controlar as algas.

#### EXEMPLO 1

Combinações de cloreto de liozima (MP Biomedicals) com cloreto de benzalcônio. O organismo testado foi *Chlorella* sp. (ATCC 7516). O período de incubação foi de 18 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Liozima [A]	Cloreto benzalcônio [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	2 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
0,1	1	0,050	0,500	0,550
0,4	1	0,200	0,500	0,700
0,7	0,4	0,350	0,200	0,550*
1	0,1	0,500	0,050	0,550
2 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de liozima isoladamente = 2,00 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de cloreto de benzalcônio isoladamente = 2,00 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de liozima em combinação com cloreto de benzalcônio (mg produto/l)

[B] = MIC de cloreto de benzalcônio em combinação com cloreto de liozima (mg a.i./l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente

#### EXEMPLO 2

Combinações de cloreto de liozima (MP Biomedicals) com cloreto de benzalcônio. O organismo testado foi o *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). O período de incubação foi de 18 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Lisozima [A]	Cloreto benzalcônio B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	2 MIC <sub>B</sub>	0,0	1,0	1,00
0,1	1	0,1	0,50	1,50
0,4	1	0,4	0,50	0,90*
0,7	0,7	0,7	0,35	1,05
1 MIC <sub>A</sub>	0	1,0	0,00	1,00

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 1,00 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de cloreto de benzalcônio isoladamente = 2,00 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com cloreto de benzalcônio (mg produto/l)

[B] = MIC de cloreto de benzalcônio em combinação com cloreto de lisozima (mg a.i./l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente

### EXEMPLO 3

Combinações de cloreto de lisozima (MP Biomedicals) com produto BUSAN 77<sup>TM</sup>. O organismo testado foi *Chlorella sp.* (ATCC 7516). O período de incubação foi de 18 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Lisozima [A]	Produto BUSAN 77 <sup>TM</sup> [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	0,7 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
0,01	0,7	0,005	1,000	1,005
0,04	0,7	0,020	1,000	1,020
0,07	0,7	0,035	1,000	1,385
0,1	0,4	0,050	0,571	0,621*
0,4	0,04	0,200	0,057	0,257
0,7	0,04	0,350	0,057	0,407
1	0,01	0,500	0,014	0,514
2 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 2,00 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> isoladamente = 0,7 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com produto BUSAN 77<sup>TM</sup> (mg produto/l)

[B] = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> em combinação com cloreto

de lisozima (mg a.i./l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

EXEMPLO 4

- 5 Combinações de cloreto de lisozima (MP Biomedicals) com produto BUSAN 77<sup>TM</sup>. O organismo testado foi *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). O período de incubação foi de 18 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Lisozima [A]	Produto BUSAN 77 <sup>TM</sup> [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	2 MIC <sub>B</sub>	0,00	1,000	1,000
0,01	2	0,01	1,000	1,010
0,04	2	0,04	1,000	1,040
0,07	2	0,07	1,000	1,070
0,1	0,7	0,10	0,350	0,450*
0,4	0,4	0,40	0,200	0,600
0,7	0,01	0,70	0,005	0,705
1 MIC <sub>A</sub>	0	1,00	0,000	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 1,00 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> isoladamente = 2,00 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com produto BUSAN 77<sup>TM</sup> (mg produto/l)

- 15 [B] = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> em combinação com cloreto de lisozima (mg a.i./l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

EXEMPLO 5

- 20 Combinações de cloreto de lisozima (MP Biomedicals) com produto BUSAN 77<sup>TM</sup>. O organismo testado foi *Chlorella sp.* (ATCC 7516). O período de incubação foi de 34 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Lisozima [A]	Produto BUSAN 77 <sup>TM</sup> [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	2 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
0,01	2	0,005	1,000	1,005
0,04	2	0,020	1,000	1,020
0,07	0,7	0,035	0,350	0,385*
0,1	0,7	0,050	0,350	0,400
0,4	0,1	0,080	0,050	0,130

0,7	0,1	0,350	0,050	0,400
1	0,1	0,500	0,050	0,550
2 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 2,00 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> isoladamente = 2,00 mg produto/l

5 [A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com produto BUSAN 77<sup>TM</sup> (mg produto/l)

[B] = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> em combinação com cloreto de lisozima (mg a.i./l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

#### EXEMPLO 6

Combinções de cloreto de lisozima (MP Biomedicals) com produto BUSAN 77<sup>TM</sup>. O organismo testado foi *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). O período de incubação foi de 34 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Lisozima [A]	Produto BUSAN 77 <sup>TM</sup> [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	2 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
0,01	2	0,005	1,000	1,005
0,04	1	0,020	0,500	0,520*
0,07	1	0,035	0,500	0,535
0,1	0,7	0,050	0,350	0,400
0,4	0,4	0,200	0,200	0,400
0,7	0,4	0,350	0,200	0,550
1	0,1	0,500	0,050	0,550
2 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 2,00 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> isoladamente = 2,00 mg produto/l

20 [A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com produto BUSAN 77<sup>TM</sup> (mg produto/l)

[B] = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> em combinação com cloreto de lisozima (mg a.i./l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

#### EXEMPLO 7

Combinações de cloreto de lisozima (MP Biomedicals) com com produto BUSAN 77<sup>TM</sup>. O organismo testado foi *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). O período de incubação foi de 18 horas a 37°C.

Lisozima [A]	Produto BUSAN 77 <sup>TM</sup> [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	0,8 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
50	0,5	0,100	0,625	0,725*
100	0,5	0,200	0,625	0,825*
500 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

5 MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 500,0 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> isoladamente = 0,8 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com produto BUSAN 77<sup>TM</sup> (mg produto/l)

[B] = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> em combinação com cloreto de lisozima (mg produto/l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

#### 15 EXEMPLO 8

Combinações de cloreto de lisozima (MP Biomedicals) com produto BUSAN 77<sup>TM</sup>. O organismo testado foi *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). O período de incubação foi de 18 horas a 37°C.

Lisozima [A]	Produto BUSAN 77 <sup>TM</sup> [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	2 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
50	1	0,100	0,500	0,600*
50	0,8	0,100	0,400	0,500*
50	0,5	0,100	0,250	0,350*
100	1	0,200	0,500	0,700*
100	0,8	0,200	0,400	0,600*
100	0,5	0,200	0,250	0,450*
500 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

20 MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 500,0 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> isoladamente = 2,0 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com

produto BUSAN 77<sup>TM</sup> (mg produto/l)

[B] = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> em combinação com cloreto de lisozima (mg produto/l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

#### EXEMPLO 9

Combinações de cloreto de lisozima (MP Biomedicals) com produto BUSAN 77<sup>TM</sup>. O organismo testado foi *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048). O período de incubação foi de 18 horas a 37°C.

Lisozima [A]	Produto BUSAN 77 <sup>TM</sup> [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	0,8 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
50	0,5	0,05	0,625	0,650*
100	0,5	0,1	0,625	0,725*
500	0,5	0,5	0,625	1,125
>1000 MIC <sub>A</sub>	0	1	0	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 1000,0 mg produto/l

Nota: O MIC do cloreto de lisozima contra *E.aerogenes* não foi determinado dentro da faixa de concentração mostrada, porém, para demonstrar que o sinergia realmente existe, o MIC foi mostrado maior que 1000 mg produto/l, que foi a concentração testada mais alta.

MIC<sub>B</sub> = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> isoladamente = 0,8 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com produto BUSAN 77<sup>TM</sup> (mg produto/l)

[B] = MIC de produto BUSAN 77<sup>TM</sup> em combinação com cloreto de lisozima (mg produto/l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

#### EXEMPLO 10

Combinações de cloreto de lisozima (NutriScience) com cloreto de sódio. O organismo testado foi *Chlorella sp.* (ATCC 7516). O período de incubação foi de 14 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Lisozima [A]	Cloreto de sódio [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	30.000 MIC <sub>B</sub>	0,000	1,000	1,000
0,1	30.000	0,050	1,000	1,050
0,4	30.000	0,200	1,000	1,200
0,7	6.000	0,350	0,200	0,550*
1	6.000	0,500	0,200	0,700
2 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 2,00 mg produto/l

MIC<sub>B</sub> = MIC de cloreto de sódio isoladamente = 30,000 mg produto/l

5

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com cloreto de sódio (mg produto/l)

[B] = MIC de cloreto de sódio em combinação com cloreto de lisozima (mg a.i./l)

10 \* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

#### EXEMPLO 11

15 Combinações de cloreto de lisozima (NutriScience) com cloreto de sódio. O organismo testado foi *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). O período de incubação foi de 14 dias a 24°C sob 16 horas de luz e 8 horas de penumbra.

Lisozima [A]	Cloreto de sódio [B]	[A]/MIC <sub>A</sub>	[B]/MIC <sub>B</sub>	[A]/MIC <sub>A</sub> + [B]/MIC <sub>B</sub>
0	20.000 MIC <sub>B</sub>	0,0	1,00	1,00
0,1	10.000	0,1	0,50	0,60*
0,4	8.000	0,4	0,40	0,80
0,7	6.000	0,7	0,30	1,00
1 MIC <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

MIC<sub>A</sub> = MIC de cloreto de lisozima isoladamente = 2,00 mg produto/l

20 MIC<sub>B</sub> = MIC de cloreto de sódio isoladamente = 20,000 mg produto/l

[A] = MIC de cloreto de lisozima em combinação com cloreto de sódio (mg produto/l)

[B] = MIC de cloreto de sódio em combinação com cloreto de lisozima (mg a.i./l)

\* = Valor < 1 denota atividade sinérgica de ambos componentes utilizados simultaneamente.

Os depositantes especificamente incorporam os conteúdos completos de todas as referências citadas neste  
5 relatório. Além disso, quando uma quantidade, concentração, ou outro valor ou parâmetro é dado como faixa, faixa preferida, ou lista de valores superiores e inferiores preferidos, isso deve ser entendido como especificamente descrevendo todas as faixas formadas a  
10 partir de qualquer par de qualquer limite de faixa ou valor preferido superior e qualquer limite de faixa ou valor preferido inferior, independentemente se as faixas são ou não descritas separadamente. Quando uma faixa de valores numéricos é aqui citada, salvo se estabelecido de  
15 outra forma, a faixa pretende incluir os pontos finais da mesma, e todos os números inteiros e frações dentro da faixa. O escopo da invenção não tem a pretensão de ficar restrito aos valores especificados, citados ao se definir uma faixa.

20 Outras concretizações da presente invenção serão evidentes aos habilitados na técnica, com base na consideração do presente relatório e da prática da presente invenção aqui descrita. O presente relatório e exemplos pretendem ser considerados como representativos  
25 apenas, com o real escopo e espírito da invenção sendo indicado pelas reivindicações a seguir e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar o crescimento de pelo menos um microorganismo, num sistema aquoso, caracterizado pelo fato de compreender:
- 5   prover uma composição consistindo essencialmente de lisozima ao sistema aquoso.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de controlar o crescimento de algas no sistema aquoso.
- 10   3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de dita lisozima ser uma lisozima tratada termicamente ou modificada termicamente.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de dita lisozima ser um dímero de lisozima.
- 15   5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a lisozima ser adicionada ao sistema aquoso para prover uma concentração de lisozima de cerca de 0,01 a cerca de 100 ppm, preferivelmente, de cerca de 0,1 a cerca de 10 ppm.
- 20   6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o sistema aquoso ser uma piscina, banheiras de hidromassagem ou balneário.
7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o sistema aquoso ser um sistema de água recirculada contendo um gerador de cloro e sendo que o sistema de água recirculada contém de cerca de 2.000 a cerca de 6.000 ppm de cloreto de sódio.
- 25   8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o sistema aquoso ser um meio para aquacultura.
- 30   9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o sistema aquoso ser um sistema de água recirculada do qual o cloro foi removido.
10. Método para controlar o crescimento de pelo menos um microorganismo, num sistema aquoso, caracterizado pelo fato de compreender:
- 35   prover uma composição compreendendo uma combinação de

pelo menos uma lisozima e de pelo menos um composto de amônio quaternário.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de a lisozima ser adicionada ao sistema aquoso para prover uma concentração de lisozima de cerca de 0,01 a cerca de 5.000 ppm, preferivelmente, de cerca de 0,1 a cerca de 500 ppm.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de o composto de amônio quaternário ser adicionado ao sistema aquoso para prover uma concentração do composto de amônio quaternário de cerca de 0,01 a cerca de 1.000 ppm, preferivelmente, de cerca de 0,1 a cerca de 100 ppm.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de a lisozima e o composto de amônio quaternário serem adicionados ao sistema aquoso para prover uma concentração de lisozima de cerca de 0,1 a cerca de 500 ppm e uma concentração do composto de amônio quaternário de cerca de 0,1 a cerca de 100 ppm.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de controlar o crescimento de algas num sistema aquoso.

RESUMO

"MÉTODO PARA CONTROLAR O CRESCIMENTO DE PELO MENOS UM MICROORGANISMO".

5 É provido um método para exterminar, prevenir ou inibir o crescimento de microorganismos num sistema aquoso ou num substrato capaz de suportar um crescimento de microorganismos, provendo-se lisozima, seja isoladamente ou em combinação com um composto de amônio quaternário ao sistema aquoso ou substrato.