

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 688**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/00** (2006.01)

**A01P 13/00** (2006.01)

**A01N 37/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2007 E 10000341 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2181596**

54 Título: **Método para inhibir el crecimiento de microorganismos en sistemas acuosos usando una composición que comprende lisozima**

30 Prioridad:

**16.02.2006 US 355589**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**02.09.2015**

73 Titular/es:

**BUCKMAN LABORATORIES INTERNATIONAL,  
INC (100.0%)  
1256 NORTH MCLEAN BOULEVARD  
MEMPHIS, TN 38108-0305, US**

72 Inventor/es:

**VUNK, GRACIELA H. y  
MARAIS, DEBORAH A.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 544 688 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para inhibir el crecimiento de microorganismos en sistemas acuosos usando una composición que comprende lisozima

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para controlar el crecimiento de microorganismos en sistemas acuosos. Más en particular, la presente invención se refiere al tratamiento de sistemas acuosos con lisozima en combinación con compuestos de amonio cuaternario.

10

Antecedentes de la invención

Se ha usado una diversidad de materiales para controlar las algas en diferentes ambientes, tales como, pero no de manera exclusiva: compuestos basados en cloro/bromo, biguanidas, sales de cobre, compuestos basados en plata, triazinas, compuestos de amonio cuaternario y compuestos poliméricos. Cada uno de ellos tiene deficiencias relacionadas con la sensibilidad al pH y/o temperatura, estabilidad y/o compatibilidad química, eficacia limitada y toxicidad ambiental y/o para los seres humanos.

15

Por ejemplo, el cloro es higienizante/desinfectante/oxidante más ampliamente usado por los propietarios de piscinas. Es muy eficaz eliminando bacterias, algas y otros organismos vivos. El cloro se añade típicamente a una piscina en forma de comprimido o líquido o se proporciona por un generador de cloro, que es un dispositivo que contiene celdas eléctricas que generan cloro a partir de una reserva de sal añadida al agua de la piscina.

20

Sin embargo, el cloro tiene muchas desventajas que reducen el deseo de uso como desinfectante exclusivo en piscinas y otros sistemas recreativos de agua. Por ejemplo, el cloro puede combinarse con el amoniaco para formar cloraminas, que no son eficaces para higienizar, desinfectar u oxidar. El amoniaco está normalmente presente en el agua de piscina bien por factores ambientales, una suma de fertilizantes que se transportan por el viento y que caen en las piscinas, de los desechos de los nadadores (perspiración, orina, saliva y aceites corporales), o incluso de algunas lociones bronceadoras. En consecuencia, los gerentes de las piscinas cloran la piscina en exceso (> 3 ppm) para compensar la transformación del cloro en cloraminas. El exceso de cloración puede dar lugar a una absorción excesiva de cloro y cloraminas a través de la piel o por inhalación del aire o del vapor de agua que contiene cloro y cloraminas. Los atletas que entrenan durante muchas horas en una piscina, particularmente en un ambiente de interior, pueden ser particularmente susceptibles a sobreexposición a cloro y cloraminas y pueden mostrar síntomas de hipersensibilidad y afecciones respiratorias similares al asma.

25

30

35

Además, el cloro no es adecuado para ambientes de acuicultura que puedan contener plantas y animales deseados que puedan verse perjudicados por el cloro o sus subproductos. Los ejemplos de dichos ambientes incluyen acuarios, criaderos de peces, estanques de camarones, granjas de cangrejos, y similares.

40

Se sabe que la lisozima es una potente proteína antibacteriana distribuida en diversos fluidos y tejidos biológicos incluyendo los huevos de las aves, plantas, bacterias, y secreciones animales. También están presentes en las lágrimas, saliva, leche, secreciones respiratorias y de cuello de útero humanas, y se secreta por leucocitos polimorfonucleares. La lisozima se ha usado por sus propiedades antibacterianas en las industrias tanto farmacéutica como alimentaria y se ha considerado como muy segura para su uso en seres humanos. De hecho, la lisozima es uno de los factores antimicrobianos presentes en la leche humana.

45

La Patente de Estados Unidos 5.069.717 de Sherba et al. describe una composición microbicida para controlar algas que contiene una mezcla sinérgica de difeniléter y lisozima.

50

Por consiguiente, es deseable tener un método para prevenir, eliminar y/o inhibir el crecimiento de microorganismos que no sea caro y que use un ingrediente que sea eficaz a baja concentración y que esté fácilmente disponible.

También es deseable tener un método para prevenir, eliminar y/o inhibir el crecimiento de microorganismos que no use cloro u otros ingredientes no deseables desde un punto de vista ambiental.

55

Sumario de la invención

Se ha descubierto recientemente que puede obtenerse una composición antimicrobiana potente para controlar el crecimiento de microorganismos, particularmente algas, en sistemas acuosos proporcionando lisozima en combinación con al menos un compuesto cuaternario al sistema acuoso. La presente invención puede aplicarse en una diversidad de sistemas y procesos fluidos industriales (por ejemplo, sistemas acuosos), incluyendo, pero sin limitación, sistemas de agua para fabricación de papel, suspensiones de pulpa, blanqueo del papel en procesos de producción de papel, sistemas refrigerantes por agua (torres de refrigeración, aguas de refrigeración de admisión y aguas de refrigeración de efluentes), sistemas de aguas de desecho, sistemas de agua de recirculación, jacuzzis, piscinas, sistemas de aguas recreativas, sistemas de procesamiento de alimentos, sistemas para agua de bebida,

60

65

sistemas de agua de procesamiento del cuero, fluidos metalúrgicos y otros sistemas de aguas industriales.

Las características y ventajas adicionales de la presente invención se expondrán en parte de la descripción siguiente, y serán evidentes, en parte, a partir de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la presente invención. Los objetivos y otras ventajas de la presente invención se realizarán y alcanzarán mediante los elementos y combinaciones indicadas particularmente en la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior y la descripción detallada siguiente son solo ilustrativas y no restrictivas de la presente invención, tal como se reivindica.

#### Descripción detallada de la presente invención

La presente invención comprende métodos y composiciones para controlar el crecimiento de microorganismos en sistemas acuosos usando lisozima en combinación con al menos un compuesto de amonio cuaternario.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, el control o la inhibición del crecimiento de al menos un microorganismo incluye la reducción y/o prevención de dicho crecimiento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sistema acuoso" incluye sistemas de aguas recreativas, particularmente sistemas de agua de recirculación, tales como jacuzzis, spas y piscinas y sistemas de fluidos industriales, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de aguas de producción de papel, suspensiones de pulpa, blanqueo del papel en procesos de producción de papel, sistemas refrigerantes por agua (torres de refrigeración, aguas de refrigeración de admisión y aguas de refrigeración de efluentes), sistemas de aguas de desecho, sistemas de procesamiento de alimentos, sistemas para agua de bebida, sistemas de agua de procesamiento del cuero, fluidos metalúrgicos y otros sistemas de aguas industriales.

La presente invención es particularmente adecuada para sistemas acuosos de aguas que entran en contacto con organismos superiores, que no se ven perjudicados por la lisozima debido a su baja toxicidad. Por lo tanto, la presente invención puede usarse, por ejemplo, para controlar microorganismos, por ejemplo, algas, en piscinas, spas y jacuzzis y para controlar algas en sistemas de aguas usados en acuicultura, incluyendo criaderos de peces, piscifactorías, estanques de camarones, estanques de cangrejos, moluscos y similares.

Como ejemplo, la lisozima puede añadirse a un sistema de agua salina, tal como un sistema de agua que usa un sistema de cloración salina. El sistema de agua puede contener de 2.000 ppm a 8.000 ppm, o de 2.800 ppm a 6.000 ppm de cloruro de sodio. Debido a la actividad de la lisozima para controlar algas y/o otros microorganismos, puede haber una necesidad reducida de poner en funcionamiento el generador de cloro en dicho sistema de aguas, reduciendo de este modo el coste eléctrico y reduciendo la probabilidad de efectos no deseados debidos al exceso de cloración.

También puede añadirse lisozima para controlar algas y otros microorganismos en un sistema acuoso que se ha tratado para reducir o eliminar el cloro. Por ejemplo, los acuarios pueden contener especies vegetales y animales que son sensibles al cloro, incluso en la cantidad que está presente en las fuentes de aguas municipales convencionales, de tal modo que el agua usada en estos tiene que filtrarse o tratarse para eliminar el cloro. Por tanto, la lisozima puede proporcionar al menos parte de la actividad de control de microorganismos que se pierde por la reducción o la eliminación del cloro.

Debe entenderse además que por "controlar" (por ejemplo, prevenir) el crecimiento de al menos un microorganismo, se inhibe al menos parcialmente el crecimiento del microorganismo. En otras palabras, no hay crecimiento o esencialmente nada de crecimiento del microorganismo. "Controlar" el crecimiento de al menos un microorganismo mantiene la población del microorganismo a un nivel deseado, reduce la población a un nivel deseado (incluso hasta niveles indetectables) y/o inhibe al menos parcialmente el crecimiento del microorganismo. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, los productos, materiales o medios susceptibles de ser atacados por el al menos un microorganismo están protegidos al menos parcialmente de este ataque y del daño y otros efectos perjudiciales causados por el microorganismo. Además, también debe entenderse que "controlar" el crecimiento de al menos un microorganismo también incluye reducir y/o mantener bioestadísticamente un nivel bajo de al menos un microorganismo, de tal modo que se mitigan el ataque por el microorganismo y cualquier daño resultante u otros efectos perjudiciales, es decir, la velocidad de crecimiento del microorganismo o la velocidad de ataque del microorganismo se frenan y/o eliminan. Las composiciones de la presente invención tienen preferentemente una baja toxicidad.

Los ejemplos de estos microorganismos incluyen hongos, bacterias, algas, y mezclas de los mismos, tales como, pero sin limitación, por ejemplo, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, y *Chlorella sp.* Un ejemplo adicional es un microorganismo Gram-positivo, tal como una especie de *Bacillus*.

La lisozima normalmente se nombra en nomenclatura enzimática como "EC:3.2.1.17" y también se llama normalmente muramidasa. La lisozima usada en la presente invención puede proceder de cualquier fuente de lisozima conocida, tal

como de cualquier fuente vegetal o animal y puede obtenerse mediante cualquier método de producción, aislamiento o purificación enzimática, incluyendo medios recombinantes. La lisozima está disponible comercialmente en forma purificada a escala industrial. Típicamente, la enzima purificada se encuentra en forma de un sólido de color blanco.

5 Opcionalmente, la lisozima puede ser una lisozima tratada con calor o una lisozima térmicamente modificada. La lisozima puede ser un dímero de lisozima. La lisozima puede modificarse térmicamente, por ejemplo, calentando la lisozima a una temperatura elevada, tal como por calentamiento en un baño de agua. La temperatura puede ser cualquier temperatura suficiente para modificar la lisozima, por ejemplo, para formar un dímero de lisozima. Por ejemplo, puede usarse una temperatura de aproximadamente 50 °C o mayor, tal como de 70 °C a 100 °C, más particularmente, una temperatura de 80 °C, durante al menos 20 minutos. Para los fines de la presente invención, puede estar presente más de un tipo de lisozima. Por ejemplo, puede estar presente una lisozima no modificada con una lisozima térmicamente modificada. Además, el dímero de lisozima puede tener presentes otras lisozimas. Por ejemplo, la lisozima de la presente invención puede tener desde un 5% de dímero de lisozima presente hasta un 50% de dímero de lisozima presente o más. Por ejemplo, el dímero de lisozima puede estar presente en una cantidad de desde un 1% hasta un 50% o de un 10% a un 35%. La lisozima tratada con calor o térmicamente modificada puede actuar como una desnaturalización por calor parcial o completa de la lisozima. Tal como se ha indicado, puede usarse cualquier combinación de lisozimas en la presente invención.

20 Tal como se describe en el presente documento, la adición o presencia de al menos un compuesto de amonio cuaternario potencia la actividad antimicrobiana cuando se usan con lisozima, y potencia particularmente la actividad antialgas. Por ejemplo, hay compuestos de amonio cuaternario, tales como cloruro de alquil dimetil bencil amonio, disponibles comercialmente como alguicidas. El uso de un compuesto de amonio cuaternario puede proporcionar un espectro más amplio de actividad antialgas o puede proporcionar una eficacia aumentada contra algas problemáticas. En particular, se cree que la lisozima y un compuesto de amonio cuaternario actúan sinérgicamente para proporcionar un sistema antimicrobiano particularmente útil y económico.

30 El compuesto de amonio cuaternario usado para proporcionar efectos antimicrobianos sinérgicos de acuerdo con la presente invención se selecciona entre cloruro de N,N-dietil-N-dodecil-N-bencilamonio, cloruro de N,N-dimetil-N-octadecil-N-(dimetil-bencil)amonio, cloruro de N,N-dimetil-N,N-didecilamonio, cloruro de N,N-dimetil-N,N-didodecilamonio, cloruro de N,N,N-trimetil-N-tetradecilamonio, cloruro de N-bencil-N,N-dimetil-N-(alquil C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)amonio, cloruro de N-(diclorobencil)-N,N-dimetil-N-dodecilamonio, cloruro de N-hexadecilpiridinio, bromuro de N-hexadecilpiridinio, bromuro de N-hexadecil-N,N,N-trimetilamonio, cloruro de N-dodecilpiridinio, bisulfato de N-dodecilpiridinio, cloruro de N-bencil-N-dodecil-N,N-bis(beta-hidroxi-etil)amonio, cloruro de N-dodecil-N-bencil-N,N-dimetilamonio, cloruro de N-bencil-N,N-dimetil-N-(alquil C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)amonio, etilsulfato de N-dodecil-N,N-dimetil-N-etilamonio, cloruro de N-dodecil-N,N-dimetil-N-(1-naftilmetil)amonio, cloruro de N-hexadecil-N,N-dimetil-N-bencilamonio o cloruro de N-dodecil-N,N-dimetil-N-bencilamonio. El compuesto de amonio cuaternario también puede ser un compuesto de amonio policuaternario, es decir, poli(dicloruro de oxietilen-(dimetilimino)etilen(dimetil-iminio)etileno), que está disponible comercialmente con los nombres comerciales WSCP y Busan 77 de Buckman Laboratories International, Inc.

40 Como método para eliminar, o prevenir o inhibir el crecimiento de microorganismos en un sistema acuoso, la lisozima y el compuesto de amonio cuaternario puede proporcionarse al sistema acuoso en condiciones en las que la lisozima y el compuesto de amonio cuaternario actúan para proporcionar un agente antimicrobiano que elimina, o previene o inhibe el crecimiento de microorganismos en el sistema acuoso.

45 Un experto en la materia puede determinar la cantidad eficaz de lisozima y compuesto de amonio cuaternario útil para una aplicación particular simplemente probando diversas concentraciones antes del tratamiento de un sistema completo afectado. Por ejemplo, en un sistema acuoso que se va a tratar, la concentración de lisozima puede ser cualquier cantidad eficaz, tal como desde 0,01 ppm hasta 5.000 ppm, y cuando se tratan algas, un intervalo preferido es desde 0,01 ppm hasta 2.000 ppm, y está preferentemente en el intervalo de desde 0,1 hasta 500 ppm.

El compuesto de amonio cuaternario puede estar presente en el sistema acuoso en cualquier cantidad eficaz, tal como en un intervalo de desde 0,01 ppm hasta 1.000 ppm y preferentemente en el intervalo de 0,1 ppm hasta 100 ppm.

55 Las concentraciones de lisozima y compuesto de amonio cuaternario tal como se describen anteriormente o tal como se describen en otras partes en esta solicitud pueden ser las concentraciones iniciales de los componentes en el momento en que los componentes se combinan o añaden a un sistema acuoso y/o pueden ser las concentraciones de los componentes en cualquier instante después de que los componentes hayan interactuado con el sistema acuoso.

60 La lisozima y el al menos un compuesto de amonio cuaternario pueden añadirse por separado a un sistema acuoso o pueden combinarse para formar una composición que se añade al sistema acuoso. Si se añaden por separado, el orden de la adición de componentes no es crítico y puede usarse cualquier orden.

65 El método de la presente invención puede ponerse en práctica a cualquier pH, tal como un intervalo de pH de desde aproximadamente 2 a aproximadamente 11, con un intervalo de pH preferible de desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9. Para un sistema acuoso que estará en contacto con organismos superiores, tales como seres

humanos o peces, el pH debe ser neutro (aproximadamente pH 7). El pH del sistema acuoso puede ajustarse añadiendo ácidos o bases tal como se conoce en la técnica. El ácido o la base añadida deben seleccionarse para que no reaccionen con cualquier componente en el sistema. Sin embargo, es preferible añadir la lisozima y el compuesto de amonio cuaternario al agua sin ajuste de pH.

El método de la presente invención puede usarse en cualquier sistema acuoso industrial o recreativo que requiera el control de microorganismos. Dichos sistemas incluyen, pero sin limitación, fluidos metalúrgicos sistemas refrigerantes por agua (torres de refrigeración, aguas de refrigeración de admisión y aguas de refrigeración de efluentes), sistemas de aguas residuales, incluyendo aguas residuales o aguas sanitarias que se sometan al tratamiento de los desechos en el agua, por ejemplo, tratamiento de aguas residuales, sistemas de agua de recirculación, piscinas, jacuzzis, sistemas de procesamiento de alimentos, sistemas para agua de bebida, sistemas de agua de procesamiento del cuero, sistemas de aguas blancas, suspensiones de pulpa u otros sistemas de agua de elaboración de papel o de procesamiento del papel. En general, cualquier sistema de agua industrial o recreativa puede beneficiarse de la presente invención. El método de la presente invención también puede usarse en el tratamiento de aguas de admisión para dichos diversos procesos industriales o instalaciones recreativas. El agua de admisión puede tratarse primeramente mediante el método de la presente invención de tal forma que se inhibe el crecimiento microbiano antes de que el agua de admisión entre en el proceso industrial o instalación recreativa.

La presente invención se aclarará adicionalmente por los siguientes ejemplos, que tienen por objeto ser ilustrativos de la presente invención.

### Ejemplos

#### *Procedimientos Generales*

**A. Evaluación de actividad alguicida.** Este método de ensayo proporciona una técnica para probar la eficacia de compuestos par inhibir (reprimir) el crecimiento de algas. Los valores de CMI representan la Concentración Mínima Inhibidora, definida como el nivel más bajo de compuesto necesario para inhibir (reprimir) por completo el crecimiento de un organismo dado. Aparatos:

*Tubos de ensayo*, 18 - 150 mm. Se necesitan tubos de ensayo esterilizados.

*Incubador*, capaz de una regulación constante de la temperatura ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y de la luz.

#### Reactivos y materiales:

$\text{KNO}_3$

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

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

Citrato de Fe-amonio (solución al 1%)

#### Soluciones madre:

Componente madre	de solución madre	g/200 g de agua desionizada
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. Metales PIV		
$\text{Na}_2$ EDTA		0,750
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0,097
$\text{MnC}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		0,041
$\text{ZnCl}_2$		0,005 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0,002 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0,004 g
Agua Desionizada		1.000,000 ml

*Inóculo.*

5 Suspensión celular de un cultivo crecido en medio modificado de Allen durante 14 días o según sea necesario para lograr una masa celular deseada de *Chlorella sp.* (ATCC 7516) o *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). El inóculo se calibra a una transmitancia del 82% medida a una longitud de onda de 590 nanómetros antes de la inoculación.

Procedimiento:

Preparación del medio:

10 *Medio de Allen modificado* (Allen, A. A., 1968).

NaNO <sub>3</sub>	1,5	g,
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0	ml de solución madre A.
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5,0	ml de solución madre B.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5,0	ml de solución madre C.
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10,0	ml de solución madre D.
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	10,0	ml de solución madre E.
Ácido cítrico	1,0	ml de solución madre F.
Metal PIV	1,0	ml de solución madre G.
Agua Desionizada	1000,0	ml.

15 Se esteriliza el medio en el autoclave durante 20 minutos a una presión de 6,8 kg (121°C). Después de esterilizar en el autoclave, se enfría el medio a 45-50°C y se administran 5 ml de medio por tubo de ensayo, después se añade el compuesto y el inóculo.

Incorporación de compuesto:

20 Se prepara una solución madre en agua del compuesto que se va a ensayar. La concentración de la solución madre depende de la dosis mayor que se desea ensayar. Se diluye la solución madre para obtener dosificaciones menores que la elegida para la solución madre. Debe añadirse una cantidad máxima de 100 microlitos de solución madre o la dilución correspondiente por cada tubo de ensayo.

25 Inoculación:

Se añaden 100 microlitos de inóculo por tubo de ensayo, por tipo de medio y por tipo de inóculo.

Incubación:

30 Se colocan los tubos de ensayo que contienen los tratamientos en un incubador configurado a 24°C. La luz se proporciona por tubos fluorescentes para el crecimiento de plantas configurados para proporcionar 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

35 Clasificación de los tubos:

Los tubos de ensayo se clasifican como positivos o negativos:

- 40 • Positivos (contaminados) cuando el medio en los tubos muestra crecimiento de algas (depósito de color verde en el fondo).
- Negativos (no contaminados) cuando el medio en los tubos permanece incoloro.
- 45 • El control siempre es positivo. La concentración mínima inhibidora (CMI) del compuesto es la concentración más pequeña que muestra crecimiento de algas negativo.

Evaluación de sinergia:

50 La sinergia se midió mediante diluciones en damero (Yan y Hancock, 2001), en las que un compuesto se diluye a lo largo de las filas de tubos de ensayo y el otro se diluye a lo largo de las columnas. Este método se centra en la búsqueda de una reducción en la CMI de cada componente en la presencia del otro. El resultado se expresa como el Índice de Concentración Inhibidora Fraccional (CIF), calculado del modo siguiente:

55  $CIF = [A]/CMI_A + [B]/CMI_B$  donde,  
 $CMI_A$  y  $CMI_B$  = CMI de los compuestos A y B solos  
 $[A]$  y  $[B]$  = CMI de los compuestos A y B cuando están en combinación

Un índice de CIF < 1 indica sinergia; un índice de 0,5 representa el equivalente a una disminución cuádruple en el CMI de cada compuesto en combinación. Un índice CIF de 1,0 representa actividad aditiva (una disminución doble en el CMI de cada compuesto en combinación), y un índice > 1 indica antagonismo; un índice > 4 representa antagonismo verdadero.

5 B. Evaluación de la actividad bacteriana. Este método es adecuado para su uso en la evaluación de las propiedades antibacterianas de agentes químicos determinando su valor CMI. El valor CMI representa la Concentración Mínima Inhibidora definida como el nivel más bajo de compuesto necesario para lograr una eliminación  $\geq 90\%$  de un organismo dado.

10 Equipamiento:

1. Tubos de ensayo, 18 x 150 mm, tubos de cultivo desechables estériles
2. Pipetas estériles de 1 ml y 10 ml
- 15 3. Incubador capaz de mantener una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
4. Autoclave
5. Medidor de pH
6. Puntas de micropipeta de 1-200  $\mu\text{l}$
7. Micropipeta Eppendorf
- 20 8. Estándar N° 1 de McFarland
9. Placas de Petri: placas de Petri desechables de plástico, tamaño de 100 x 15 mm

3. Preparación de medios:

25 1. *Agar de recuento en placa Difco:* Se rehidrata el agar suspendiendo 23,5 g en 1 l de agua desionizada y se calienta hasta ebullición para disolverlo. Se administra según se desee y se esteriliza en un autoclave de vapor durante 15 minutos a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

2. *Sustrato de sales basales, pH 7:*

Trizma® (Tris) HCl 3,9 g

Trizma® (Tris) Base. 0,05 g

(Nota: Obtener pH adecuado antes de la adición del siguiente. Ajustar con más cantidad de tampón Trizma® adecuado)

Glucosa 0,02 gramos

Peptona 0,01 gramos

Nitrato de amonio 1,0 gramos

Sulfato de magnesio, heptahidrato 0,25 gramos

Cloruro de calcio 0,25 gramos

Esterilizar en autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos

30 C. Inóculo. Suspensión celular de un cultivo bacteriano de 18 a 24 horas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) o *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) o *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) para lograr una concentración celular deseada. Usando un patrón de sulfato de bario nefelómetro de McFarland u otro método adecuado, se ajusta la concentración de la suspensión bacteriana de tal modo que se logra una concentración de entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células por ml cuando se añaden 100  $\mu\text{l}$  del inóculo a 5 ml de sustrato de sales basales.

35 D. Incorporación de compuesto. Se prepara una solución madre en agua del compuesto que se va a ensayar. La concentración de la solución madre depende de la dosis mayor que se desea ensayar. Se diluye la solución madre para obtener dosificaciones menores que la elegida para la solución madre. Debe añadirse una cantidad máxima de 100  $\mu\text{l}$  de solución madre o la dilución correspondiente por cada tubo de ensayo.

40 E. Inoculación e incubación. Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de inóculo por tubo de ensayo por tipo de medio y por tipo de inóculo, y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas.

45 F. Clasificación de los tubos mediante el método de recuento de placa. El agar para recuento en placa vertida se preparó tal como se describe en *Standard Methods* (American Public Health Association; 1995). Se colocó un mililitro de la muestra en el centro de una placa de Petri estéril (diámetro de 100 mm) usando una pipeta estéril. Se añadió agar de recuento en placa derretido ( $44$  a  $46^{\circ}\text{C}$ ) (pH 7,0) y se mezcló con la muestra removiendo la placa. Se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente hasta que se solidificaron y después se invirtieron e incubaron a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante  $48 \pm 2$  h. Las colonias formadas en o sobre el medio de recuento en placa a las  $48 \pm 2$  h se contaron tal como se describe en *Standard Methods*, y los resultados se comunican en UFC/mililitro. En los casos donde sea aplicable, este valor se multiplicó por el factor de dilución para obtener las UFC/ml corregidas.

50

En esta prueba, el CMI del compuesto es la concentración que produjo una eliminación del 90%. Esto se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Media de UFC/ml en controles} - \text{Media de UFC/ml en tratamiento}}{\text{Media de UFC/ml en controles}} \times 100$$

5 G. Evaluación de la sinergia. La sinergia se midió mediante diluciones en damero (Yan y Hancock, 2001), en las que un compuesto se diluye a lo largo de las filas de tubos de ensayo y el otro se diluye a lo largo de las columnas. Este método se centra en la búsqueda de una reducción en la CMI de cada componente en la presencia del otro. El resultado se expresa como el Índice de Concentración Inhibidora Fraccional (CIF), calculado del modo siguiente:

$$5 \quad \text{CIF} = [A]/\text{CMI}_A + [B]/\text{CMI}_B$$

donde,

15  $\text{CMI}_A$  y  $\text{CMI}_B$  = CMI de los compuestos A y B solos  
 [A] y [B] = CMI de los compuestos A y B cuando están en combinación

Un índice de CIF < 1 indica sinergia; un índice de 0,5 representa el equivalente a una disminución cuádruple en el CMI de cada compuesto en combinación. Un índice CIF de 1,0 representa actividad aditiva (una disminución doble en el CMI de cada compuesto en combinación), y un índice > 1 indica antagonismo; un índice > 4 representa antagonismo verdadero.

EJEMPLO 1

25 Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con cloruro de benzalconio. El organismo ensayado fue *Clorella sp.* (ATCC 7516). El periodo de incubación fue 18 días a 24 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Lisozima [A]	Cloruro de benzalconio [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	2 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

CMI<sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 2,00 mg de producto/l  
 CMI<sub>B</sub> = CMI de cloruro de benzalconio solo = 2,00 mg de producto/l  
 [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con cloruro de benzalconio (mg de producto/l)  
 [B] = CMI de cloruro de benzalconio en combinación con cloruro de lisozima (mg t.i./l)  
 \* = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.

EJEMPLO 2

30 Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con cloruro de benzalconio. El organismo ensayado fue *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). El periodo de incubación fue 18 días a 24 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Lisozima [A]	Cloruro de benzalconio [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	2 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,0	0,00	1,00

## ES 2 544 688 T3

Lisozima [A]	Cloruro de benzalconio [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
CMI <sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 1,00 mg de producto/l CMI <sub>B</sub> = CMI de cloruro de benzalconio solo = 2,00 mg de producto/l [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con cloruro de benzalconio (mg de producto/l) [B] = CMI de cloruro de benzalconio en combinación con cloruro de lisozima (mg t.i./l) * = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.				

### EJEMPLO 3

- 5 Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con producto BUSAN 77™. El organismo ensayado fue *Clorella sp.* (ATCC 7516). El periodo de incubación fue 18 días a 24 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	0,7 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000
CMI <sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 2,00 mg de producto/l CMI <sub>B</sub> = CIM de producto BUSAN 77™ solo = 0,7 mg de producto/l [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con producto BUSAN 77™ (mg de producto/l) [B] = CMI de producto BUSAN 77™ en combinación con cloruro de lisozima (mg t.i./l) * = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.				

### EJEMPLO 4

- 10 Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con producto BUSAN 77™. El organismo ensayado fue *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). El periodo de incubación fue 18 días a 24 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	2 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,00	0,000	1,000
CMI <sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 1,00 mg de producto/l CMI <sub>B</sub> = CIM de producto BUSAN 77™ solo = 2,00 mg de producto/l [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con producto BUSAN 77™ (mg de producto/l) [B] = CMI de producto BUSAN 77™ en combinación con cloruro de lisozima (mg t.i./l) * = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.				

EJEMPLO 5

Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con producto BUSAN 77™. El organismo ensayado fue *Clorella sp.* (ATCC 7516). El periodo de incubación fue 34 días a 24 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

5

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	2 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

CMI<sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 2,00 mg de producto/l  
 CMI<sub>B</sub> = CIM de producto BUSAN 77™ solo = 2,00 mg de producto/l  
 [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con producto BUSAN 77™ (mg de producto/l)  
 [B] = CMI de producto BUSAN 77™ en combinación con cloruro de lisozima (mg t.i./l)  
 \* = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.

EJEMPLO 6

Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con producto BUSAN 77™. El organismo ensayado fue *Phormidium faveolarum* (UTEX 427). El periodo de incubación fue 34 días a 24 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

10

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	2 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

CMI<sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 2,00 mg de producto/l  
 CMI<sub>B</sub> = CIM de producto BUSAN 77™ solo = 2,00 mg de producto/l  
 [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con producto BUSAN 77™ (mg de producto/l)  
 [B] = CMI de producto BUSAN 77™ en combinación con cloruro de lisozima (mg t.i./l)  
 \* = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.

EJEMPLO 7

Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con producto BUSAN 77™. El organismo ensayado fue *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). El periodo de incubación fue 18 a 37 °C.

15

ES 2 544 688 T3

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	0,8 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

CMI<sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 500,0 mg de producto/l  
 CMI<sub>B</sub> = CIM de producto BUSAN 77™ solo = 0,8 mg de producto/l  
 [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con producto BUSAN 77™ (mg de producto/l)  
 [B] = CMI de producto BUSAN 77™ en combinación con cloruro de lisozima (mg de producto/l)  
 \* = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.

EJEMPLO 8

- 5 Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con producto BUSAN 77™. El organismo ensayado fue *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). El periodo de incubación fue 18 a 37 °C.

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	2 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1,000	0,000	1,000

CMI<sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo = 500,0 mg de producto/l  
 CMI<sub>B</sub> = CIM de producto BUSAN 77™ solo = 2,0 mg de producto/l  
 [A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con producto BUSAN 77™ (mg de producto/l)  
 [B] = CMI de producto BUSAN 77™ en combinación con cloruro de lisozima (mg de producto/l)  
 \* = Un valor <1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.

EJEMPLO 9

- 10 Combinaciones de cloruro de lisozima (MP Biomedicals) con producto BUSAN 77™. El organismo ensayado fue *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048). El periodo de incubación fue 18 a 37 °C.

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
0	0,8 CMI <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 CMI <sub>A</sub>	0	1	0	1,000

## ES 2 544 688 T3

Lisozima [A]	Producto BUSAN 77™ [B]	[A]/CMI <sub>A</sub>	[B]/CMI <sub>B</sub>	[A]/CMI <sub>A</sub> + [B]/CMI <sub>B</sub>
<p>CMI<sub>A</sub> = CMI de cloruro de lisozima solo: &gt; 1000,0 mg de producto/l</p> <p>Nota: El CMI de cloruro de lisozima frente a <i>E. aerogenes</i> no se determinó en el intervalo de concentración mostrado, sin embargo, para demostrar que existe sinergia, se mostró como mayor de 1000 mg de producto/l, que fue la mayor concentración ensayada.</p> <p>CMI<sub>B</sub> = CIM de producto BUSAN 77™ solo = 0,8 mg de producto/l</p> <p>[A] = CMI de cloruro de lisozima en combinación con producto BUSAN 77™ (mg de producto/l)</p> <p>[B] = CMI de producto BUSAN 77™ en combinación con cloruro de lisozima (mg de producto/l)</p> <p>* = Un valor &lt;1 indica actividad sinérgica de ambos componentes usados simultáneamente.</p>				

## REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar el crecimiento de algas en un sistema acuoso, comprendiendo el método:

5 proporcionar una composición que comprende una combinación de al menos una lisozima y al menos un compuesto de amonio cuaternario seleccionado entre cloruro de N,N-dietil-N-dodecil-N-bencilamonio, cloruro de N,N-dimetil-N-octadecil-N-(dimetilbencil)amonio, cloruro de N,N-dimetil-N,N-didodecilamonio, cloruro de N,N-dimetil-N,N-didodecilamonio, cloruro de N,N,N-trimetil-N-tetradecilamonio, cloruro de N-bencil-N,N-dimetil-N-(alquil C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)amonio, cloruro de N-(diclorobencil)-N,N-dimetil-N-dodecilamonio, cloruro de N-hexadecilpiridinio, bromuro de N-hexadecilpiridinio, bromuro de N-hexadecil-N,N,N-trimetilamonio, cloruro de N-dodecilpiridinio, bisulfato de N-dodecilpiridinio, cloruro de N-bencil-N-dodecil-N,N-bis(beta-hidroxi-etil)amonio, cloruro de N-dodecil-N-bencil-N,N-dimetilamonio, cloruro de N-bencil-N,N-dimetil-N-(alquil C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)amonio, etilsulfato de N-dodecil-N,N-dimetil-N-etilamonio, cloruro de N-dodecil-N,N-dimetil-N-(1-naftilmetil)amonio, cloruro de N-hexadecil-N,N-dimetil-N-bencilamonio, cloruro de N-dodecil-N,N-dimetil-N-bencilamonio o poli(dicloruro de oxietilen-(dimetilimino)etilen(dimetil-iminio)etileno).

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha lisozima es una lisozima tratada con calor o térmicamente modificada.

20 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha lisozima es un dímero de lisozima.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el sistema acuoso es una piscina, un jacuzzi o un spa.

25 5. El método de la reivindicación 1, en el que el sistema acuoso es un sistema de agua recirculada que contiene un generador de cloro en el que el sistema de agua recirculada contiene de 2.000 a 6.000 ppm de cloruro de sodio.

6. El método de la reivindicación 1, en el que el sistema acuoso es un medio de acuicultura.

30 7. El método de la reivindicación 1, en el que el sistema acuoso es un sistema de agua recirculada del que se ha eliminado el cloro.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la lisozima se añade al sistema acuoso para proporcionar una concentración de lisozima de desde 0,01 hasta 5.000 ppm.

35 9. El método de la reivindicación 1, en el que la lisozima se añade al sistema acuoso para proporcionar una concentración de lisozima de desde 0,1 hasta 500 ppm.

10. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto de amonio cuaternario se añade al sistema acuoso para proporcionar una concentración del compuesto de amonio cuaternario de desde 0,01 hasta 1.000 ppm.

40 11. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto de amonio cuaternario se añade al sistema acuoso para proporcionar una concentración del compuesto de amonio cuaternario de desde 0,1 hasta 100 ppm.

45 12. El método de la reivindicación 1, en el que la lisozima y el compuesto de amonio cuaternario se añaden al sistema acuoso para proporcionar una concentración de lisozima de desde 0,1 hasta 500 ppm y una concentración del compuesto de amonio cuaternario de desde 0,1 hasta 100 ppm.