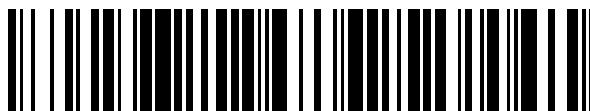


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 384**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/46** (2006.01)  
**A01N 43/50** (2006.01)  
**A23B 4/20** (2006.01)  
**A61L 2/00** (2006.01)  
**A61L 2/16** (2006.01)  
**A61L 12/14** (2006.01)  
**C11D 3/00** (2006.01)  
**A01P 3/00** (2006.01)  
**A01P 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09772444 .7**  
96 Fecha de presentación: **30.06.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2348842**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2011**

54

Título: **Uso de tensioactivos catiónicos como agentes esporicidas**

30

Prioridad:

**02.07.2008 EP 08382025**  
**03.09.2008 US 93787 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

**10.12.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**10.12.2012**

73

Titular/es:

**LABORATORIOS MIRET, S.A. (100.0%)**  
**Pol. Industrial Can Parellada C/ Géminis, no. 4**  
**08228 Les Fonts de Terrassa, Barcelona, ES**

72

Inventor/es:

**ROCABAYERA BONVILA, XAVIER;**  
**FIGUERAS ROCA, SERGI;**  
**SEGRET PONS, ROGER y**  
**PIERA EROLES, EVA**

74

Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 392 384 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).

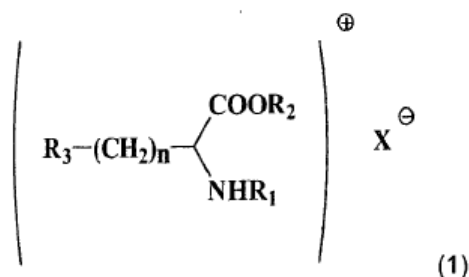
**DESCRIPCIÓN**

Uso de tensioactivos catiónicos como agentes esporicidas.

La presente solicitud se refiere a un nuevo uso de los tensioactivos catiónicos.

5 Los tensioactivos catiónicos son conocidos como conservantes usados en alimentos, cosméticos y en la industria farmacéutica. Los tensioactivos catiónicos han resultado ser altamente eficaces contra la proliferación microbiana y al mismo tiempo ser seguros para la ingesta en los seres humanos y mamíferos en general. Por todo esto, los tensioactivos catiónicos son un instrumento atractivo en la industria.

10 Se ha demostrado que los tensioactivos catiónicos según la fórmula (1) obtenidos a partir de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados son sustancias protectoras altamente eficaces contra los microorganismos.



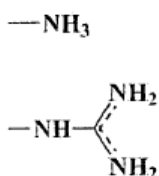
en la que:

X<sup>-</sup> es un contraión derivado de un ácido orgánico o inorgánico, preferiblemente Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, o un anión basado en un compuesto fenólico;

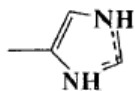
15 R<sub>1</sub>: es una cadena alquílica lineal de un ácido o hidroxiácido graso saturado que tiene de 8 a 14 átomos unida al grupo α-aminoácido mediante un enlace amídico;

R<sub>2</sub>: es una cadena alquílica lineal o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono o un grupo aromático;

R<sub>3</sub>: es



20 o



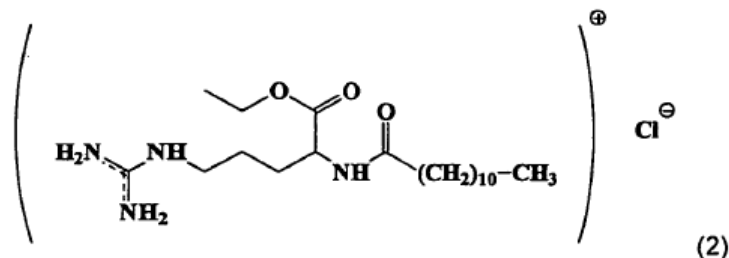
en la que n es un número entero de 0 a 4.

25 Los ácidos orgánicos que pueden ser la fuente del contraión X<sup>-</sup> pueden ser ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido glucónico, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido benzoico, ácido carbónico, ácido glutámico u otros aminoácidos, ácido láurico y ácidos grasos tales como ácido oleico y ácido linoleico, mientras que los ácidos inorgánicos pueden ser ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido tiocianico.

El compuesto fenólico que puede ser la base del anión X<sup>-</sup> es por ejemplo hidroxianisol butilado (BHA) y los compuestos relacionados hidroxitolueno butilado, *terc*-butilhidroquinona y parabenos tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno.

30 El compuesto más preferido de la clase anterior de compuestos es el éster etílico de la lauramida del monohidrocloreto de arginina, de aquí en adelante denominado LAE (CAS No. 60372-77-2). Este compuesto es bien

conocido ahora por su uso como agente antimicrobiano. En la práctica, el LAE ha resultado ser bien tolerado y presentar una toxicidad muy baja para los seres humanos. El compuesto LAE tiene la estructura química de la fórmula (2) presentada a continuación.



5 El compuesto LAE es notable por su actividad frente a diferentes microorganismos, tales como bacterias, mohos y levaduras que pueden estar presentes en los productos alimenticios (documento WO 03/034842) y también en las formulaciones y preparaciones de cosméticos (documentos WO 03/013453, WO 03/013454 y WO 03/043593). Se ha descrito el uso antiviral del producto (documento WO 2008/014824)

10 La preparación general de los tensioactivos catiónicos está descrita en la patente española ES 512643 y en las solicitudes de patentes internacionales WO 96/21642, WO 01/94292 y WO 03/064669.

15 El compuesto LAE, conocido también como arginato láurico, es fabricado por los Laboratorios Miret, S.A. (LAMIRSA, España). El arginato láurico está listado por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) como una sustancia GRAS (Generalmente reconocida como segura) bajo la notificación GRN 000164. El USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos) ha aprobado su uso en productos cárnicos y de aves de corral (FSIS Directiva 7120.1)) y también como ayuda del proceso para la productos de carne fresca y de aves de corral.

Se ha estudiado el metabolismo del tensioactivo catiónico anterior de la fórmula (2) en ratas; estos estudios han demostrado una absorción y metabolización rápida con formación de aminoácidos naturales y del ácido graso ácido láurico, que son eventualmente excretados como dióxido de carbono y urea. Los estudios toxicológicos han demostrado que el compuesto LAE es completamente inofensivo para los animales y los seres humanos.

20 Por lo tanto, el LAE y los compuestos relacionados son particularmente adecuados para ser utilizados en la conservación de todos los productos alimenticios perecederos. El compuesto LAE y los compuestos relacionados son igualmente adecuados para uso en productos cosméticos.

25 Como se ha hecho notar anteriormente, los tensioactivos catiónicos son notables por su acción inhibitoria sobre la proliferación de diferentes microorganismos, tales como bacterias, hongos y levaduras. Las concentraciones mínimas inhibitorias (M.I.C.) de LAE se muestran en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Clase	Microorganismo	M.I.C. (ppm)
Bacterias Gram +	<i>Arthrobacter oxydans</i> ATCC 8010	64
	<i>Bacillus cereus</i> var <i>mycoide</i> ATCC 11778	32
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16
	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 77454	16
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	10
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	32
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9631	128
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i> CECT 372	16
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CETC 912	32
	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	64
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	128
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 22636	64

## ES 2 392 384 T3

Clase	Microorganismo	M.I.C. (ppm)
Bacterias Gram -	<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 689	32
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	32
	<i>Escherichia coli</i> 0157H7	20
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> var <i>pneumoniae</i> CECT 178	32
	<i>Proteus mirabilis</i> CECT 170	32
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	64
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC16028	32
	<i>Serratia marcescens</i> CECT 274	2
	<i>Mycobacterium phlei</i> ATCC 41423	
Hongos	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 14604	32
	<i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 9348	16
	<i>Gliocadium virens</i> ATCC 4645	32
	<i>Chaetonium globosum</i> ATCC 6205	16
	<i>Penicillium chrysogenum</i> CECT 2802	128
	<i>Penicillium funiculosum</i> CECT 2914	16
Levaduras	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	16
	<i>Rhodotorula rubra</i> CECT 1158	16
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	32

- 5 Es preferible disolver el compuesto directamente antes del uso en uno de los siguientes disolventes preferidos de calidad alimentaria: agua, etanol, propilenglicol, alcohol isopropílico, otros glicoles, mezclas de glicoles y mezclas de glicoles y agua, diacetina, triacetina, glicerol, sorbitol, manitol y xilitol. Si el tratamiento se debe realizar a un valor específico de pH puede ser recomendable el uso de una solución tampón correspondiente. Por otro lado el compuesto se puede usar fácilmente en su forma sólida o puede ser formulado con excipientes sólidos tales como sal, azúcar, maltodextrina, hidrocoloides y sorbitol.
- 10 Para los tensioactivos catiónicos de la anterior fórmula (1) la actividad antibacteriana y la actividad biológica frente a otros microorganismos tales como hongos y levaduras está bien documentada.
- 15 El tratamiento eficaz de la infección bacteriana está regularmente limitado debido a la capacidad de ciertas bacterias para producir endosporas.
- Una endospora es una estructura aletargada, resistente, y no reproductiva producida por un pequeño número de bacterias del filo (phylum) Firmicute. La función principal de la mayor parte de las endosporas es asegurar la supervivencia de una bacteria durante periodos de estrés ambiental. Son por tanto resistentes a la radiación ultravioleta y a la radiación gamma, a la desecación, a las lisozimas, temperatura, estarcación y desinfectantes químicos. Las endosporas se encuentran comúnmente en el suelo y en el agua, donde pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo. Se encuentran también en los alimentos, cosméticos y en las superficies de los equipos. Algunas bacterias producen en lugar de endosporas, exosporas o cistos.
- 20 Las endosporas son resistentes a la mayor parte de los agentes que normalmente matarían las células vegetativas a partir de las cuales se forman. Los productos de limpieza del hogar generalmente no tienen ningún efecto, ni tampoco lo tienen la mayor parte de los alcoholes, compuestos cuaternarios y detergentes. Sin embargo, los agentes alquilantes, tales como óxido de etileno, son eficaces contra las endosporas.
- 25 Aunque son resistentes al calor extremo y a la radiación, las endosporas se pueden destruir sometiéndolas a calor abrasador o por autoclavado. La exposición al calor extremo durante un período de tiempo suficientemente largo generalmente tendrá algún efecto, aunque muchas endosporas pueden sobrevivir durante horas de ebullición o cocinado. La exposición prolongada a radiación de alta energía, tal como rayos X y rayos gamma, también destruirá

la mayor parte de las endosporas. En el documento US 2004/0204496 A1 están descritas soluciones desinfectantes que son eficaces frente a las endosporas bacterianas.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un agente adicional para destruir las endosporas.

5 Ha sido el resultado sorprendente de las investigaciones realizadas por los presentes inventores que los tensioactivos catiónicos según la fórmula (1) anterior presentan una actividad esporicida. Nunca antes había sido descrita tal actividad esporicida de los conservantes catiónicos.

La actividad de los tensioactivos catiónicos se observa frente a esporas de bacterias y mohos, tal como frente a las endosporas de bacterias y mohos.

10 Una observación adicional sorprendente de los presentes inventores, ha sido que los tensioactivos catiónicos presentan también una actividad esporicida frente a las endosporas generadas por los hongos.

Esto hace posible un tratamiento muy activo de cualquier objeto que pueda estar infectado con la presencia de esporas de diferentes fuentes.

15 El tensioactivo catiónico que se utiliza en la presente invención se obtiene de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados, y tiene la fórmula (1) anterior, siendo la especie más preferida de los tensioactivos catiónicos de la fórmula (1) el éster etílico de arginato láurico de la anterior fórmula (2).

Los tensioactivos catiónicos se pueden administrar del modo más conveniente como una solución en un disolvente adecuado, pero también es posible realizar el tratamiento del objeto a limpiar mediante la aplicación de la forma sólida o de la formulación sólida.

20 Si los tensioactivos catiónicos se aplican como una solución, y el objeto a limpiar es cualquier producto que se destina al consumo por los seres humanos o los animales, la base líquida de la solución puede ser cualquier líquido que sea adecuado para uso en la preparación de alimentos. Tales líquidos son agua, propilenglicol, etanol, o glicerina. También son posibles mezclas de estos líquidos.

El término agua se puede referir a agua del grifo, agua desmineralizada, agua destilada, o soluciones de cualquier sal adecuada en agua.

25 Es preferible la disolución de los tensioactivos catiónicos en soluciones acuosas. Como vehículo para la solución, el agua, tal como agua del grifo o agua desmineralizada, es el más adecuado, pero también son posibles soluciones en salmuera.

30 Es posible la adición de otros disolventes, tales como cualquier disolvente orgánico, siempre que este disolvente adicional añadido no tenga ningún efecto sobre el consumo final por los consumidores humanos. En general, no hay ninguna ventaja específica por la adición de otros disolventes y la administración de una solución en agua del grifo es suficiente para los fines usuales.

35 Si el tratamiento se dirige a un objeto que no se destina directamente al consumo por seres humanos o animales, la composición no está sometida a los mismos requisitos estrictos y se pueden elegir soluciones más agresivas. Dichos objetos pueden ser superficies de algún entorno industrial que pueden estar contaminadas con bacterias y mohos que producen endosporas.

40 Para el efecto deseado sobre las esporas se necesita alcanzar una concentración suficiente del tensioactivo catiónico de la fórmula (1). Se ha observado que tal concentración suficiente se alcanza cuando la solución contiene el tensioactivo catiónico de la fórmula (1), más en particular según la realización preferida cuando contiene el compuesto LAE, en una concentración de 0,001 a 5 % en peso. Una concentración más preferida está en el intervalo de 0,01 a 2,5 % en peso y la concentración más preferible en el intervalo de 0,05 a 0,1 % en peso.

45 La aplicación de la forma sólida sobre una superficie debería llevar a una concentración sobre la superficie tratada de los tensioactivos catiónicos de la fórmula (1), más en particular según la realización preferida a una concentración de LAE, de un nivel que sea suficiente para alcanzar la acción biológica deseada en tales superficies. Se debe esperar que tal nivel suficiente de concentración esté en el intervalo de 10 a 20.000 ppm, más preferiblemente de 200 a 15.000 ppm y aún más preferiblemente de 500 a 12.000 ppm. Estas concentraciones están dadas en términos de la concentración de una solución que contiene el tensioactivo catiónico que se aplica a las superficies a tratar. Si las superficies se tratan con una preparación sólida del tensioactivo catiónico de la fórmula (1), la cantidad que se aplica debe ser tal, que la cantidad del tensioactivo catiónico de la fórmula (1) esté en el intervalo de 0,05 a 200 mg/dm<sup>2</sup>, preferiblemente una cantidad de 0,5 a 150 mg/dm<sup>2</sup>, más preferiblemente una cantidad de 1 a 100 mg/dm<sup>2</sup> y 50 lo más preferiblemente una cantidad de 5 a 80 mg/dm<sup>2</sup>.

5 Es posible una combinación con otros productos, por ejemplo con fosfatos, polisorbatos, agentes quelantes, nisina, lisozima, y otros productos reconocidos ya como esporicidas. Por ejemplo la composición acuosa para el tratamiento esporicida puede contener una cantidad adecuada de tripolifosfato de sodio. Dicha cantidad adecuada está entre 10 y 10.000 ppm y el intervalo preferido está entre 100 y 1.000 ppm. Cuando la combinación es con polisorbatos, la cantidad adecuada está entre 10 y 100.000 ppm, siendo el polisorbato 20 el polisorbato preferido. Cuando la combinación es con nisina, la cantidad adecuada está entre 10 y 600 ppm y cuando la combinación se hace con lisozima la cantidad adecuada está en el intervalo de 20 a 400 ppm.

**Ejemplo 1**

10 La determinación de la actividad esporicida de LAE se ha llevado a cabo según la norma europea EN 13704:2002: "Desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad esporicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividades. Método de ensayo y requisitos"

El propósito del ejemplo es demostrar la actividad de LAE sobre las endosporas bacterianas producidas por el organismo de ensayo *Bacillus subtilis*.

15 Se preparó una suspensión de ensayo que contiene endosporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a partir de un cultivo sobre un agar-agar nutriente, al que se añadieron ingredientes adicionales de potenciación de la esporulación. Se recogió la cosecha de las placas con agua estéril y se purificaron las endosporas por repetidas centrifugaciones y resuspensiones en agua.

20 Neutralizador. La mezcla neutralizadora consistió en 12,7 % de polisorbato 80, 6,0 % de Tamol® SN (marca de la sal de sodio de condensado de naftaleno-formaldehído), 1,7 % de lecitina, 1 % de peptona y 0,1 % de cistina. La solución se destinó a neutralizar los compuestos químicos de forma que no afecten al posterior crecimiento de las bacterias.

La actividad esporicida de un producto dado se define por su capacidad para reducir al menos en 10<sup>3</sup> la cantidad de esporas bacterianas de *Bacillus subtilis* en suspensión, en las condiciones establecidas en el método.

25 El compuesto LAE es producido por Lamirsa.

Se pone en contacto el producto con una suspensión de esporas bacterianas durante un período de tiempo establecido de 60 minutos. Se puede añadir a la suspensión una sustancia interferente, en este caso seroalbúmina bovina al 0,3 % en agua destilada. Después, se neutraliza el efecto del producto añadiendo un neutralizador previamente elegido, antes del recuento de las esporas supervivientes.

30 Procedimiento:

1. Suspensión de esporas obtenidas de un cultivo esporulado de *Bacillus subtilis*.
2. Recuento de la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis*.
3. Se evalúa el posible efecto tóxico del neutralizador sobre las esporas en ausencia del producto.
4. Evaluación del efecto neutralizante del neutralizador sobre el producto.

35 4. Evaluación del efecto inhibitor del producto.

5. Cálculo de resultados.

Resultados:

Los resultados se expresan como la reducción de la viabilidad de la suspensión de esporas con respecto a:

- Validación de la neutralización del producto,
- 40 - Validación de la no toxicidad del neutralizador,
- Actividad esporicida del producto.

Tabulación de los resultados de validación del método y del ensayo (a 20 °C):

Suspensión madre de esporas	1,5 × 10 <sup>9</sup> cfu/mL
Validación del método, control	1,2 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL

Toxicidad del neutralizador	1,8 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Control del neutralizador	1,8 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Suspensión de esporas de ensayo (N)	3,8 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL ensayos de validación 1,8 × 10 <sup>7</sup> cfu/mL ensayos del producto	
Ensayo de actividad esporicida de LAE (µg/mL) (N <sub>a</sub> )	12,5 µg/mL	>300 cfu/mL (incontables)
	25 µg/mL	>300 cfu/mL (incontables)
	50 µg/mL	5,2 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	100 µg/mL	5,3 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	150 µg/mL	4,2 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	250 µg/mL	Ninguna cfu/mL
	300 µg/mL	Ninguna cfu/mL

cfu: unidades formadoras de colonias

Los resultados del ensayo de validación indican que el neutralizador usado (solución de Polisorbato 80 en agua al 2 %) no es tóxico y neutraliza el efecto del producto, porque en ambos casos el recuento de esporas viables es similar al de la solución utilizada en los respectivos ensayos.

- 5 La actividad esporicida se calcula como sigue:

$$R = N \times 0,1 / N_a$$

N es el número de cfu/mL de la suspensión de esporas.

N<sub>a</sub> es el número de cfu/mL de la actividad esporicida.

La reducción calculada de una solución de:

- 10 50 ppm de LAE es R = 3,5 × 10<sup>2</sup> cfu/mL  
 100 ppm de LAE es R = 3,4 × 10<sup>2</sup> cfu/mL  
 150 ppm de LAE es R = 4,3 × 10<sup>2</sup> cfu/mL  
 250 ppm de LAE es R > 10<sup>3</sup> cfu/mL

- 15 Los datos muestran, que a partir de una concentración de LAE de 50 ppm hay inhibición de la germinación de esporas.

Un producto se considera esporicida si su uso produce una reducción en el número de esporas bacterianas de *Bacillus subtilis* igual o superior a 10<sup>3</sup> después de estar en contacto durante 60 minutos en las condiciones fijadas en la norma EN 13704:2000.

- 20 Por lo tanto, el compuesto LAE presenta una actividad esporicida frente a las endosporas de *Bacillus subtilis* a concentraciones iguales o superiores a 250 ppm. La especie es la especie usual en el ensayo de la actividad esporicida. La especie pertenece al mismo género que el organismo bacteriano que produce el ántrax. Debido a sus similitudes genéticas, las esporas de *B. subtilis* han sido utilizadas como un reemplazo no patógeno de las esporas de *Bacillus anthracis*, la bacteria del ántrax. Se espera que los presentes resultados sean aplicables al ántrax.

### Ejemplo 2

- 25 La determinación de la actividad fungicida de LAE se ha llevado a cabo según la norma europea UNE-EN 1275: "Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad fungicida. Método de ensayo y requisitos".

La actividad fungicida de un producto dado se define por su capacidad para reducir al menos en 10<sup>4</sup> la cantidad de esporas fúngicas de *Aspergillus niger* en suspensión, en las condiciones establecidas en el método.

El compuesto LAE es producido por Lamirsa.

## ES 2 392 384 T3

Se pone en contacto el producto con una suspensión de esporas fúngicas durante un período de tiempo establecido (60 minutos). Después de este tiempo, se neutraliza el efecto del producto añadiendo una solución de Polisorbato 80 al 2 % en agua, antes del recuento de las esporas supervivientes.

Procedimiento:

- 5 1. Suspensión de esporas obtenidas de un cultivo esporulado de *Aspergillus niger*.
2. Recuento de la suspensión de esporas de *Aspergillus niger*.
3. Se evalúa el posible efecto tóxico del neutralizador sobre las esporas en ausencia del producto.
4. Evaluación del efecto neutralizante del neutralizador sobre el producto.
5. Evaluación del efecto fungicida del producto.
- 10 6. Cálculo de resultados.

Resultados:

Los resultados se expresan como la reducción de la viabilidad de la suspensión de esporas con respecto a:

- Validación de la neutralización del producto,
- Validación de la no toxicidad del neutralizador,
- 15 - Actividad fungicida del producto.

Tabulación de los resultados de validación del método y del ensayo (a 20 °C):

Suspensión madre de esporas	1,8 × 10 <sup>9</sup> cfu/mL	
Validación del método, control	3,5 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL	
Toxicidad del neutralizador	3,8 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Control del neutralizador	2,7 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Suspensión de esporas de ensayo (N)	4 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL ensayo de validación 5 × 10 <sup>7</sup> cfu/mL ensayo del producto	
Ensayo de actividad fungicida de LAE (µg/mL) (N <sub>a</sub> )	12,5 µg/mL	>300 cfu/mL (incontables)
	25 µg/mL	>300 cfu/mL (incontables)
	50 µg/mL	>300 cfu/mL (incontables)
	100 µg/mL	1,6 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL
	200 µg/mL	3,9 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	300 µg/mL	3,5 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	400 µg/mL	3,0 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	500 µg/mL	Ninguna cfu/mL
	1000 µg/mL	Ninguna cfu/mL

cfu: unidades formadoras de colonias

La actividad fungicida se calcula como sigue:

$$R = N \times 0,1 / N_a$$

20 N es el número de cfu/mL de la suspensión de esporas fúngicas.

Na es el número de cfu/mL de la actividad fungicida.

La reducción calculada de una solución de:



100 µg/mL de LAE es  $R = 3,1 \times 10^2$  cfu/mL

200 µg/mL de LAE es  $R = 1,3 \times 10^3$  cfu/mL

300 µg/mL de LAE es  $R = 1,4 \times 10^3$  cfu/mL

400 µg/mL de LAE es  $R = 1,7 \times 10^3$  cfu/mL

5 500 µg/mL de LAE es  $R > 10^4$  cfu/mL

Como se ve, a partir de 100 ppm hay inhibición de la germinación de esporas fúngicas.

A partir de 500 ppm, se ha observado una inhibición total de la germinación de esporas fúngicas.

10 Un producto se considera fungicida si su uso produce una reducción en el número de esporas fúngicas de *Aspergillus niger* igual o superior a  $10^4$  después de estar en contacto durante 60 minutos en las condiciones fijadas en la norma UNE-EN 1275.

Por lo tanto, el compuesto LAE es fungicida a concentraciones iguales o superiores a 500 ppm.

### Ejemplo 3

15 La determinación de la actividad esporicida de LAE se ha llevado a cabo según la norma europea EN 13704:2002: "Desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad esporicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividades. Método de ensayo y requisitos"

El propósito del ejemplo es demostrar la actividad de LAE sobre las endosporas bacterianas producidas por el organismo de ensayo *Geobacillus stearothermophilus*.

20 Se preparó una suspensión de ensayo que contiene endosporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 a partir de un cultivo sobre un agar-agar nutritivo, al que se añadieron ingredientes adicionales de potenciación de la esporulación. Se recogió la cosecha de las placas con agua estéril y se purificaron las endosporas por repetidas centrifugaciones y resuspensiones en agua.

Neutralizador. La mezcla neutralizadora consistió en 30 g/L de polisorbato 80 en agua. La solución se destinó a neutralizar los compuestos químicos de forma que no afecten al posterior crecimiento de las bacterias.

25 La actividad esporicida de un producto dado se define por su capacidad para reducir al menos en  $10^3$  la cantidad de esporas bacterianas de *Geobacillus stearothermophilus* en suspensión, en las condiciones establecidas en el método.

El compuesto LAE es producido por Lamirsa.

30 Se pone en contacto el producto con una suspensión de esporas bacterianas durante un período de tiempo establecido de 60 minutos. Se puede añadir a la suspensión una sustancia interferente, en este caso agua. Después, se neutraliza el efecto del producto añadiendo un neutralizador previamente elegido, antes del recuento de las esporas supervivientes.

Procedimiento:

1. Suspensión de esporas obtenidas de un cultivo esporulado de *Geobacillus stearothermophilus*
- 35 2. Recuento de la suspensión de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.
3. Se evalúa el posible efecto tóxico del neutralizador sobre las esporas en ausencia del producto.
4. Validación del método de dilución-neutralización.
5. Evaluación del efecto esporicida inhibitor del producto.
6. Cálculo de resultados.

40 Resultados:

Los resultados se expresan como la reducción de la viabilidad de la suspensión de esporas con respecto a:

- Validación de la neutralización del producto,

- Validación de la no toxicidad del neutralizador,
- Actividad esporicida del producto.

Tabulación de los resultados de validación del método y del ensayo (a 40 °C):

Suspensión madre de esporas	2,8 × 10 <sup>8</sup> cfu/mL	
Validación del método, control	1,3 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL	
Toxicidad del neutralizador	1,1 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL	
Control del neutralizador	1,2 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL	
Suspensión de esporas de ensayo (N)	1,6 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL ensayo de validación 1,3 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL ensayo del producto	
Ensayo de actividad esporicida de LAE (µg/mL) (N <sub>a</sub> )	58 µg/mL	1,0 × 10 <sup>5</sup> cfu/mL
	115 µg/mL	5,2 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL
	173 µg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	230 µg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	460 µg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL

cfu: unidades formadoras de colonias

- 5 Los resultados del ensayo de validación indican que el neutralizador usado (30 g/L de polisorbato 80 en agua) no es tóxico y neutraliza el efecto del producto porque en ambos casos el recuento de esporas viables es similar al de la solución utilizada en los respectivos ensayos.

La actividad esporicida se calcula siguiendo los criterios de la norma EN 13704: 2002

$$R = N \times 0,1 / N_a$$

- 10 N es el número de cfu/mL de la suspensión de esporas  
N<sub>a</sub> es el número de cfu/mL de la actividad esporicida

La reducción calculada (R) a diferente concentración de LAE frente a *G. stearothermophilus* es:

- 58 µg/ml de LAE es R < 10<sup>3</sup> cfu/mL  
115 µg/ml de LAE es R < 10<sup>3</sup> cfu/mL  
15 173 µg/ml de LAE es R > 10<sup>3</sup> cfu/mL  
230 µg/ml de LAE es R > 10<sup>3</sup> cfu/mL  
460 µg/ml de LAE es R > 10<sup>3</sup> cfu/mL

- 20 Un producto se considera esporicida, si su uso produce una reducción (R) en el número de esporas bacterianas de *Geobacillus stearothermophilus* igual o superior a 10<sup>3</sup> después de estar en contacto durante 60 minutos en las condiciones fijadas en la norma EN 13704:2002.

Por lo tanto, el compuesto LAE presenta una actividad esporicida frente a las endosporas de *Geobacillus stearothermophilus* a concentraciones iguales o superiores a 173 µg/ml.

#### Ejemplo 4

- 25 La determinación de la actividad esporicida de LAE se ha llevado a cabo según la norma europea EN 13704:2002: "Desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad esporicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividades. Método de ensayo y requisitos"

El propósito del ejemplo es demostrar la actividad de LAE sobre las endosporas bacterianas producidas por el organismo de ensayo *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

## ES 2 392 384 T3

Se preparó una suspensión de ensayo que contiene endosporas de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ATCC 7956 a partir de un cultivo sobre un agar-agar nutritivo, al que se añadieron ingredientes adicionales de potenciación de la esporulación. Se recogió la cosecha de las placas con agua estéril y se purificaron las endosporas por repetidas centrifugaciones y resuspensiones en agua.

- 5 Neutralizador. La mezcla neutralizadora consistió en 30 g/L de polisorbato 80 en agua. La solución se destinó a neutralizar los compuestos químicos de forma que no afecten al posterior crecimiento de las bacterias.

La actividad esporicida de un producto dado se define por su capacidad para reducir al menos en  $10^3$  la cantidad de esporas bacterianas de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* en suspensión, en las condiciones establecidas en el método.

- 10 El compuesto LAE es producido por Lamirsa.

Se pone en contacto el producto con una suspensión de esporas bacterianas durante un período de tiempo establecido de 60 minutos. Se puede añadir a la suspensión una sustancia interferente, en este caso agua. Después, se neutraliza el efecto del producto añadiendo un neutralizador previamente elegido, antes del recuento de las esporas supervivientes.

- 15 Procedimiento:

1. Suspensión de esporas obtenidas de un cultivo esporulado de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.
2. Recuento de la suspensión de esporas de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.
3. Se evalúa el posible efecto tóxico del neutralizador sobre las esporas en ausencia del producto.
4. Validación del método de dilución-neutralización.

- 20 5. Evaluación del efecto esporicida inhibitor del producto.

6. Cálculo de resultados.

Resultados:

Los resultados se expresan como la reducción de la viabilidad de la suspensión de esporas con respecto a:

- Validación de la neutralización del producto,
- 25 - Validación de la no toxicidad del neutralizador,
- Actividad esporicida del producto.

Tabulación de los resultados de validación del método y del ensayo (a 20 °C):

Suspensión madre de esporas	1,0 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL	
Validación del método, control	4 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Toxicidad del neutralizador	5 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Control del neutralizador	3 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Suspensión de esporas de ensayo (N)	5 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL ensayo de validación 0,65 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL ensayo del producto	
Ensayo de actividad esporicida de LAE (µg/mL) (N <sub>a</sub> )	32 µg/mL	2,7 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	51 µg/mL	1,6 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	102 µg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	205 µg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL

cfu: unidades formadoras de colonias

- 30 Los resultados del ensayo de validación indican que el neutralizador usado (30 g/L de polisorbato 80 en agua) no es tóxico y neutraliza el efecto del producto porque en ambos casos el recuento de esporas viables es similar al de la solución utilizada en los respectivos ensayos.

La actividad esporicida se calcula siguiendo los criterios de la norma EN 13704:2002:

$$R = N \times 0,1 / N_a$$

N es el número de cfu/mL de la suspensión de esporas

N<sub>a</sub> es el número de cfu/mL de la actividad esporicida

5 La reducción calculada de una solución de:

32 µg/mL de LAE es  $R < 10^3$  cfu/mL

51 µg/mL de LAE es  $R < 10^3$  cfu/mL

102 µg/mL de LAE es  $R > 10^3$  cfu/mL

205 µg/mL de LAE es  $R > 10^3$  cfu/mL

10 Un producto se considera esporicida si su uso produce una reducción (R) en el número de esporas bacterianas de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* igual o superior a  $10^3$  después de estar en contacto durante 60 minutos en las condiciones fijadas en la norma EN 13704:2002.

Por lo tanto, el compuesto LAE presenta una actividad esporicida frente a las endosporas de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* en concentraciones iguales o superiores a 102 µg/mL.

#### 15 Ejemplo 5

La determinación de la actividad esporicida de LAE se ha llevado a cabo según la norma europea EN 13704:2002: "Desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad esporicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividades. Método de ensayo y requisitos"

20 El propósito del ejemplo es demostrar la actividad de LAE sobre las endosporas bacterianas producidas por el organismo de ensayo *Clostridium sporogenes*.

Se preparó una suspensión de ensayo que contiene endosporas de *Clostridium sporogenes* ATCC 7955 a partir de un cultivo sobre un agar-agar nutriente, al que se añadieron ingredientes adicionales de potenciación de la esporulación. Se recogió la cosecha de las placas con agua estéril y se purificaron las endosporas por repetidas centrifugaciones y resuspensiones en agua.

25 Neutralizador. La mezcla neutralizadora consistió en 30 g/L de polisorbato 80 en agua. La solución se destinó a neutralizar los compuestos químicos de forma que no afecten al posterior crecimiento de las bacterias.

La actividad esporicida de un producto dado se define por su capacidad para reducir al menos en  $10^3$  la cantidad de esporas bacterianas de *Clostridium sporogenes* en suspensión, en las condiciones establecidas en el método.

30 El compuesto LAE es producido por Lamirsa.

Se pone en contacto el producto con una suspensión de esporas bacterianas durante un período de tiempo establecido de 60 minutos. Se puede añadir a la suspensión una sustancia interferente, en este caso agua. Después, se neutraliza el efecto del producto añadiendo un neutralizador previamente elegido, antes del recuento de las esporas supervivientes.

35 Procedimiento:

1. Suspensión de esporas obtenidas de un cultivo esporulado de *Clostridium sporogenes*.
2. Recuento de la suspensión de esporas de *Clostridium sporogenes*.
3. Se evalúa el posible efecto tóxico del neutralizador sobre las esporas en ausencia del producto.
4. Validación del método de dilución-neutralización.

40 5. Evaluación del efecto esporicida inhibitor del producto.

6. Cálculo de resultados.

Resultados:

Los resultados se expresan como la reducción de la viabilidad de la suspensión de esporas con respecto a:

- Validación de la neutralización del producto,
  - Validación de la no toxicidad del neutralizador,
- 5 - Actividad esporicida del producto.

Tabulación de los resultados de validación del método y del ensayo (a 20 °C):

Suspensión madre de esporas	1,3 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL	
Validación del método, control	1,3 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Toxicidad del neutralizador	5 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Control del neutralizador	6 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	
Suspensión de esporas de ensayo (N)	8 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL ensayo de validación 1,3 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL ensayo del producto	
Ensayo de actividad esporicida de LAE (µg/mL) (N <sub>a</sub> )	13 µg/mL	3,3 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	26 µg/mL	2,3 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL
	51 µg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	64 µg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL

cfu: unidades formadoras de colonias

Los resultados del ensayo de validación indican que el neutralizador usado (30 g/L de polisorbato 80 en agua) no es tóxico y neutraliza el efecto del producto porque en ambos casos el recuento de esporas viables es similar al de la solución utilizada en los respectivos ensayos.

10

La actividad esporicida se calcula siguiendo los criterios de la norma EN 13704: 2002

$$R = N \times 0,1 / N_a$$

N es el número de cfu/mL de la suspensión de esporas.

N<sub>a</sub> es el número de cfu/mL de la actividad esporicida.

15

La reducción calculada (R) de una solución de:

13 µg/mL de LAE es R<10<sup>3</sup> cfu/mL

26 µg/mL de LAE es R<10<sup>3</sup> cfu/mL

51 µg/mL de LAE es R>10<sup>3</sup> cfu/mL

64 µg/mL de LAE es R>10<sup>3</sup> cfu/mL

20

Un producto se considera esporicida si su uso produce una reducción en el número de esporas bacterianas de *Clostridium sporogenes* igual o superior a 10<sup>3</sup> después de estar en contacto durante 60 minutos en las condiciones fijadas en la norma EN 13704:2002.

Por lo tanto, el compuesto LAE presenta una actividad esporicida frente a las endosporas de *Clostridium sporogenes* en concentraciones iguales o superiores a 51 µg/mL.

25

**Ejemplo 6**

La determinación de la actividad esporicida de una combinación de LAE con tripolifosfato de sodio se ha llevado a cabo según la norma europea EN 13704:2002: “Desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad esporicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividades. Método de ensayo y requisitos”.

El propósito del ejemplo es demostrar la actividad de la combinación de LAE y tripolifosfato de sodio sobre las endosporas bacterianas producidas por el organismo de ensayo *Geobacillus stearothermophilus*.

5 Se preparó una suspensión de ensayo que contiene endosporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 a partir de un cultivo sobre un agar-agar nutritivo, al que se añadieron ingredientes adicionales de potenciación de la esporulación. Se recogió la cosecha de las placas con agua estéril y se purificaron las endosporas por repetidas centrifugaciones y resuspensiones en agua.

Neutralizador. La mezcla neutralizadora consistió en 30 g/L de polisorbato 80 en agua. La solución se destinó a neutralizar los compuestos químicos de forma que no afecten al posterior crecimiento de las bacterias.

10 La actividad esporicida de un producto dado se define por su capacidad para reducir al menos en  $10^3$  la cantidad de esporas bacterianas de *Geobacillus stearothermophilus* en suspensión, en las condiciones establecidas en el método.

El compuesto LAE es producido por Lamirsa.

Se ensayaron las siguientes soluciones:

- 15 (1) una solución de LAE (al 1 %) y polisorbato 20 (al 7,5 %);
- (2) una solución de tripolifosfato de sodio (al 5 %) y polisorbato 20 (al 10 %);
- (3) una solución que contiene LAE (al 1 %), tripolifosfato de sodio (al 0,2 %), polisorbato 20 (al 7,5 %) y cloruro de sodio (al 0,4 %);
- (4) una solución que contiene LAE (al 1 %), tripolifosfato de sodio (al 5,0 %) y polisorbato 20 (al 7,5 %).

20 Los productos se pusieron en contacto con una suspensión de esporas bacterianas durante un período de tiempo establecido de 60 minutos. Se puede añadir a la suspensión una sustancia interferente, en este caso seroalbúmina bovina al 0,3 % en agua destilada. Después, se neutraliza el efecto del producto añadiendo un neutralizador previamente elegido, antes del recuento de las esporas supervivientes.

Procedimiento:

1. Suspensión de esporas obtenidas de un cultivo esporulado de *Geobacillus stearothermophilus*.
- 25 2. Recuento de la suspensión de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.
3. Se evalúa el posible efecto tóxico del neutralizador sobre las esporas en ausencia del producto.
4. Validación del método de dilución-neutralización.
5. Evaluación del efecto esporicida inhibitor del producto.
6. Cálculo de resultados.

30 Resultados:

Los resultados se expresan como la reducción de la viabilidad de la suspensión de esporas con respecto a:

- Validación de la neutralización del producto,
- Validación de la no toxicidad del neutralizador,
- Actividad esporicida del producto.

35 Tabulación de los resultados de validación del método y del ensayo (a 20 °C):

Suspensión stock de esporas	$1,8 \times 10^9$ cfu/mL
Validación de las condiciones experimentales (A)	$1,3 \times 10^3$ cfu/mL
Validación de la toxicidad del neutralizador (B)	$1,1 \times 10^4$ cfu/mL
Validación de la dilución-neutralización (C) 64 µg/mL de LAE	$1,4 \times 10^3$ cfu/mL

ES 2 392 384 T3

Ensayo de validación de la suspensión de esporas ( N <sub>v</sub> )	1,8 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL ensayo de validación	
Ensayo del producto en la suspensión de esporas ( N)	1,8 × 10 <sup>6</sup> cfu/mL ensayo del producto	
Actividad esporicida de F.1 (mg/mL) (N <sub>a</sub> )	255 mg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	25 mg/mL	1,7 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL
	12,75 mg/mL	8,9 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL
	6,37 mg/mL	>10 <sup>2</sup> cfu/mL
	3,18 mg/mL	>10 <sup>2</sup> cfu/mL
Actividad esporicida de F.2 (mg/mL) (N <sub>a</sub> )	51,2 mg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	5,12 mg/mL	1 × 10 <sup>1</sup> cfu/mL
	2,56 mg/mL	1,5 × 10 <sup>1</sup> cfu/mL
	1,27 mg/mL	>10 <sup>2</sup> cfu/mL
	0,64 mg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
Actividad esporicida de F.3 (mg/mL) (N <sub>a</sub> )	255 mg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	25,5 mg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	12,75 mg/mL	1,0 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL
	6,37 mg/mL	1,0 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL
	3,18 mg/mL	5,9 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL
Actividad esporicida de F.4 (mg/mL) (N <sub>a</sub> )	51,2 mg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	5,12 mg/mL	<10 <sup>2</sup> cfu/mL
	2,56 mg/mL	7 × 10 <sup>1</sup> cfu/mL
	1,27 mg/mL	3,5 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL
	0,64 mg/mL	3,4 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL

cfu: unidades formadoras de colonias

Los resultados del ensayo de validación indican que el neutralizador usado (30 g/L de polisorbato 80 en agua) no es tóxico y neutraliza el efecto del producto porque en ambos casos el recuento de esporas viables es similar al de la solución utilizada en los respectivos ensayos.

- 5 Siguiendo los criterios de la norma EN 13704:2002, se calcula la actividad esporicida utilizando la siguiente expresión:

$$R = N \times 0,1 / N_a$$

N es el número de cfu/mL de la suspensión de ensayo de esporas.

- 10 N<sub>a</sub> es el número de cfu/mL del ensayo de esporas después del ensayo de la actividad esporicida del producto.

La reducción en viabilidad encontrada para los productos ensayados a diferente concentración frente a *G. stearothermophilus* fueron:

ES 2 392 384 T3

F.1 (AG-024) (mg/mL)	Contenido de LAE (µg/mL)	Reducción (R) (cfu./mL)
255	2040	$R > 10^3$
25,5	204	$R = 10^3$
12,75	102	$R < 10^3$
6,37	51	$R < 10^3$
3,18	25,5	$R < 10^3$

F.2 (AG-024) (mg/mL)	Contenido de TPP (µg/mL)	Reducción (R) (cfu./mL)
51,2	2048	$R > 10^3$
5,12	205	$R > 10^3$
2,56	102	$R = 10^3$
1,27	51	$R < 10^3$
0,64	26	$R < 10^3$

F.3 (AG-024) (mg/mL)	Contenido de LAE (µg/mL)	Contenido de TPP (µg/mL)	Reducción (R) (cfu./mL)
255	2040	408	$R > 10^3$
25,5	204	41	$R > 10^3$
12,75	102	20	$R > 10^3$
6,37	51	10	$R > 10^3$
3,18	26	5	$R < 10^3$

F.4 (AG-024) (mg/mL)	Contenido de LAE (µg/mL)	Contenido de TPP (µg/mL)	Reducción (R) (cfu./mL)
51,20	4090	2048	$R > 10^3$
5,12	41	205	$R > 10^3$
2,56	20	102	$R > 10^3$
1,27	10	51	$R < 10^3$
0,64	5	26	$R < 10^3$

TPP: tripolifosfato de sodio

5 Según la norma EN 13704:2002, la actividad esporicida del producto para *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 se evalúa cuando se encuentra al menos una reducción de  $10^3$  cfu/mL.

F.1 a una concentración de 25,5 mg/mL después de 1 hora de contacto a 20 °C tiene actividad esporicida. Esto es 204 µg/ml de LAE

F.2 a una concentración de 2,56 mg/mL después de 1 hora de contacto a 20 °C tiene actividad esporicida. Esto es 102 µg/ml de tripolifosfato



## ES 2 392 384 T3

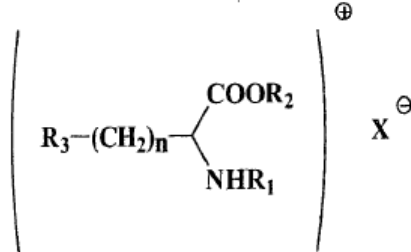
F.3 a una concentración de 6,37 mg/mL después de 1 hora de contacto a 20 °C tiene actividad esporicida. Esto es 51 µg/ml de LAE

F.4 a una concentración de 2,56 mg/mL después de 1 hora de contacto a 20 °C tiene actividad esporicida. Esto es 20 µg/ml de LAE.

5

REIVINDICACIONES

1. El uso de un tensioactivo catiónico obtenido de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados, según la siguiente fórmula (1):



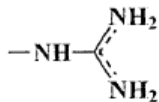
5 en la que:

X<sup>-</sup> es Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, un contraión derivado de un ácido orgánico o inorgánico, o un anión basado en un compuesto fenólico;

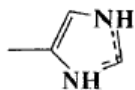
R<sub>1</sub>: es una cadena alquílica lineal de un ácido o hidroxiácido graso saturado de 8 a 14 átomos unida al grupo α-aminoácido mediante un enlace amídico;

10 R<sub>2</sub>: es una cadena alquílica lineal o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono o un grupo aromático;

R<sub>3</sub>: es

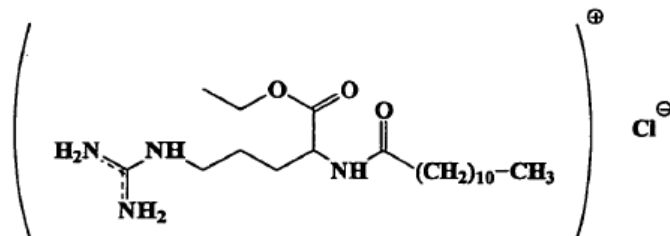


o



15 en la que n es un número entero de 0 a 4, para tratamiento esporicida.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo catiónico de la fórmula (1) es el éster etílico de la lauramida del monohidrocloruro de arginina (LAE) de la fórmula (2).



20 3. El uso según la reivindicación 1 o 2, para el tratamiento de las esporas producidas por bacterias.

4. El uso según la reivindicación 1 o 2, para el tratamiento de las esporas producidas por hongos.

5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tensioactivo catiónico se administra como una solución en un disolvente seleccionado de agua, propilenglicol, etanol, glicerina o una mezcla de estos líquidos.
- 5 6. El uso según la reivindicación 5, en el que la solución contiene un componente adicional tal como conservantes, antioxidantes, tensioactivos, espesantes, inhibidores enzimáticos, sales orgánicas e inorgánicas, ácidos orgánicos e inorgánicos y excipientes líquidos y sólidos.
7. El uso según la reivindicación 5 o 6, en el que la concentración del tensioactivo catiónico en la solución está en el intervalo de 0,0001 a 5 % en peso.
- 10 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tensioactivo catiónico se combina con polisorbatos a un intervalo de nivel de dosis entre 10 y 100.000 ppm.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que el tensioactivo catiónico se combina con polisorbatos a un intervalo de nivel de dosis entre 100 y 10.000 ppm.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tensioactivo catiónico se combina con un agente esporicida adicional.
- 15 11. El uso según la reivindicación 10, en el que el agente esporicida adicional es tripolifosfato de sodio a un intervalo de nivel de dosis entre 10 y 10.000 ppm.
12. El uso según la reivindicación 11, en el que el intervalo de nivel de dosis de tripolifosfato de sodio está entre 100 y 1.000 ppm.
- 20 13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las esporas están presentes en los alimentos, cosméticos y sobre las superficies de los equipos.