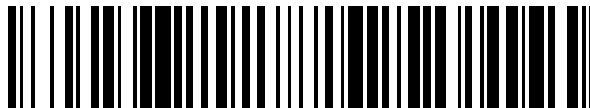


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 054**

51 Int. Cl.:

A01N 37/12 (2006.01)
A01N 25/04 (2006.01)
A23B 4/20 (2006.01)
C02F 1/50 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01)
A23L 3/34 (2006.01)
C11D 3/20 (2006.01)
C11D 3/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2005 E 05815754 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1833298**

54 Título: **Emulsiones antibacterianas concentradas estables de monocaprina en agua**

30 Prioridad:

17.12.2004 IS 7603

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

04.07.2013

73 Titular/es:

**THORMAR, HALLDOR (33.3%)
Langagerdi 54
108 Reykjavik , IS;
HILMARSSON, HILMAR (33.3%) y
BERGSSON, GUDMUNDUR (33.3%)**

72 Inventor/es:

**THORMAR, HALLDOR;
HILMARSSON, HILMAR y
BERGSSON, GUDMUNDUR**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 411 054 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

Emulsiones antibacterianas concentradas estables de monocaprina en agua.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un método de fabricación de emulsiones concentradas de aceite en agua de 1-monoglicérido de ácido cáprico (monocaprina o monocaprato de glicerol) que son estables a temperatura ambiente durante al menos un año y están específicamente diseñadas para destruir rápidamente bacterias de descomposición y patógenas transmitidas por alimentos en una dilución de hasta 200 veces de los concentrados en agua. Las emulsiones microbicidas diluidas están destinadas preferiblemente a usarse 1) como desinfectantes para reducir el número de bacterias patógenas transmitidas por alimentos, tales como *Campylobacter spp.*, en agua potable contaminada con el objetivo de prevenir la propagación de las bacterias a animales sanos, particularmente pollos; 2) como aditivos para agua potable y pienso de animales infectados, particularmente pollos, para reducir el número de bacterias patógenas, tales como *Campylobacter spp.*, en sus intestinos; 3) como desinfectantes para reducir el número de bacterias patógenas transmitidas por alimentos en alimento contaminado, tal como aves de corral crudas, con el objetivo de hacer que el alimento sea más seguro para el consumo humano; 4) para desinfectar superficies contaminadas con bacterias transmitidas por alimentos para contrarrestar la propagación de las bacterias a seres humanos por contacto con las superficies contaminadas; 5) para el tratamiento de canales en el matadero, particularmente de aves de corral, o de otra carne y pescado crudo para reducir el crecimiento de bacterias de descomposición y prolongar la vida útil de almacenamiento del producto.

Antecedentes de la invención

Campylobacter jejuni es la causa más común de infección transmitida por alimentos. Hay una estimación de 2,1 a 2,4 millones de casos de campilobacteriosis humana cada año en los EE.UU. y *C. jejuni* provoca el 46% de todos los casos confirmados en laboratorio de gastroenteritis bacteriana. Le sigue en prevalencia infecciones por *Salmonella* (28%), *Shigella* (17%) y *Escherichia coli* 0157 (5%). (Altekruse S.F. *et al.*, *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Diseases, vol. 5, n.º 1, enero-marzo de 1999). Las infecciones por *Campylobacter* son comunes en todo el mundo, tanto en países desarrollados como en desarrollo.

Campylobacter son bacterias microaerófilas con forma de espiral, Gram-negativas que se encuentran en muchos alimentos de origen animal. Tanto animales salvajes como domésticos se infectan con *C. jejuni*, tales como pollos. Los animales portan las bacterias en sus intestinos pero normalmente no muestran signos de enfermedad. En manadas de pollos, *C. jejuni* se propaga fácilmente de ave a ave a través de una fuente de agua común o a través del contacto con excrementos infectados. En el sacrificio, *Campylobacter* puede propagarse de los intestinos a las canales, y los recuentos bacterianos aumentan enormemente durante el desplumado y eviscerado. Más de la mitad de los pollos crudos en el mercado de los EE.UU. tienen *Campylobacter* en la piel. *Campylobacter* se transfiere a los seres humanos por manipulación de carne cruda, particularmente aves de corral crudas, y comiendo aves de corral poco cocinadas. Un número muy pequeño de organismos de *Campylobacter*, o menos de 500, pueden provocar enfermedad en seres humanos pero la tasa de infección aumenta con la dosis infectada. La infección por *C. jejuni* en seres humanos provoca fiebre, cólicos y diarrea, que frecuentemente es hemorrágica. Menos frecuentemente, la infección conduce a bacteriemia, artritis séptica y otros síntomas extraintestinales. Han surgido cepas resistentes a fármacos de *C. jejuni*, lo más frecuentemente tras permitirse el uso de fluoroquinolona en aves de corral en los EE.UU. y Europa. La tasa de infecciones entéricas resistentes a fármacos es máxima en los países en desarrollo en los que es común el uso de fármacos antimicrobianos en seres humanos y animales.

Debido a la alta tasa de enfermedad diarreica provocada en todo el mundo por bacterias transmitidas por alimentos y la gravedad de las infecciones, tanto en sufrimiento humano como pérdidas económicas, es importante desarrollar medios para controlar la transmisión de las bacterias de alimentos, tales como aves de corral, a seres humanos. Un enfoque es prevenir la infección en pollos de engorde eliminando *Campylobacter* o *Salmonella* de su agua potable mediante la adición de productos químicos tales como cloro (White P.L., Baker A.R. y James W.O. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 16, 525-541, 1997) o ácidos orgánicos a pH bajo. Otro enfoque es reducir el nivel de colonización bacteriana en el tubo digestivo de los animales de engorde mediante la adición de productos químicos a sus piensos (Engel L.B., Urlings H.A.P., Wagenaar J.A., van Knapen F. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. Vet. Microbiol. 99:259-267, 2004). Se han realizado muchos intentos para tratar canales de aves de corral contaminadas en el matadero con productos químicos antibacterianos. Se han usado varios compuestos para este fin con éxito variable, por ejemplo fosfato de trisodio, una mezcla de ácidos fórmico, acético y propiónico a pH bajo, cloro y agua electrolizada (Slavik M.F. *et al.* Effect of trisodium phosphate on *Campylobacter* attached to post-chill chickens. J.Food Prot.57, 324-326, 1994; Rathgeber B.M. y Waldroup A.L. Antibacterial activity of a sodium acid pyrophosphate product in chiller water against selected bacteria on broiler carcasses. J. Food Prot. 58, 530-534, 1995). A pesar de todos los esfuerzos, la contaminación de aves de corral crudas y productos alimenticios relacionados sigue siendo un problema de salud grave. Por tanto, serían deseables métodos nuevos y más eficaces para descontaminar o evitar la contaminación de alimentos tales como carne cruda y aves de corral por patógenos tales como *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli*.

El acontecimiento crítico en la propagación de patógenos transmitidos por alimentos a seres humanos se produce en la cocina cuando se prepara el alimento contaminado para cocinarlo. Se han hecho varios estudios sobre la eficacia de detergentes y jabones para el lavado de platos comunes para descontaminar utensilios y tablas para cortar y otras superficies de contacto (Scott E. *et al.* Evaluation of disinfectants in the domestic environment under "in use" conditions. J. Hyg. Camb. 92, 193-203, 1984; Cogan T.A. *et al.* The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. Letters Appl. Microbiol. 29, 354-358, 1999). Estos estudios mostraron sólo una reducción limitada en los recuentos bacterianos. Se obtuvieron mejores resultados con desinfectantes químicos tales como geles antisépticos (Zhao P. *et al.* Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. J. Food Prot. 61, 960-963, 1998). Sin embargo, hay una necesidad de desinfectantes de cocina alternativos derivados de fuentes naturales.

Se han usado numerosos conservantes químicos para retardar el crecimiento de microorganismos de descomposición en carnes y otros productos alimenticios para prolongar su vida útil de almacenamiento (Hwang C-A. y Beuchat L. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage micro-organisms on chicken skin. J. Food Prot. 58, 19-23, 1995; Ouattara B. *et al.* Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. Int. J. Food Microbiol. 37, 155-162, 1997). Sin embargo, el número de compuestos químicos permisibles para este fin es limitado debido a una posible toxicidad y a consideraciones medioambientales. Por tanto sería deseable desarrollar un producto natural de calidad alimenticia con eficacia probada como conservante alimenticio.

Se han sometido a prueba las actividades microbicidas de ácidos grasos y sus 1-monoglicéridos frente a varias especies bacterianas (Thormar H. y Bergsson G., Antimicrobial effects of lipids. Recent Devel. Antiviral Res. 1, 157-173, 2001). Así, se encontró que bacterias Gram-negativas se destruían rápidamente por varios lípidos, tanto ácidos grasos como monoglicéridos, aunque con una diferencia considerable en sus perfiles de actividad. Se encontró que todas las especies bacterianas sometidas a prueba, o bien Gram-negativas o bien Gram-positivas, eran particularmente susceptibles a monocaprina (monocaprato de glicerol) que es un 1-monoglicérido de ácido cáprico (Bergsson G., Steingrimsson Ó. y Thormar H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. Int. J. Antimicrob. Agents 20, 258-262, 2002). Los ácidos grasos de cadena media y sus monoglicéridos, tales como monocaprina, son productos de degradación de triglicéridos que son comunes en diversas grasas, tanto de animales, por ejemplo en leche, como de vegetales, tales como en aceite de coco. Son inocuos para el cuerpo en concentraciones que destruyen virus y bacterias, por ejemplo en el estómago, y se clasifican como GRAS (generalmente reconocido como seguro, "generally recognized as safe") por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. (Code of Federal Regulations, 1999. título 21, vol. 3, parte 184, sec. 184.1505, p. 505. U.S. Government Printing Office). Están aprobados como aditivos de alimentos por la UE. (E471). De 11 lípidos sometidos a prueba, se encontró que la monocaprina era la más microbicida frente a *C. jejuni*, reduciendo el recuento bacteriano viable en más de 6 log₁₀ tras ponerse en contacto durante un minuto (Thormar H., Hilmarsson H., y Bergsson G. Stable concentrated emulsions of 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against *Campylobacter*, *Salmonella* and *Escherichia coli*. Manuscrito no publicado, 2005). Por tanto, se consideró que la monocaprina era prometedora como posible desinfectante de estas bacterias transmitidas por alimentos.

En las patentes estadounidenses n.ºs 4.997.851 y 5.434.182 se describen las actividades microbicidas de lípidos y su posible aplicación para destruir microorganismos. En la patente estadounidense n.º 5.624.958 se describe su aplicación para desinfectar lentes de contacto y en la solicitud internacional PCT n.º WO98/20872 y la correspondiente patente estadounidense n.º 6.596.763 B1 se describe su aplicación para contrarrestar infecciones transmitidas por vía sexual.

Éste último documento (US 6.596.763 B1) describe en particular hidrogeles, y ejemplos (por ejemplo el ejemplo 1) en los que se somete a prueba la actividad microbicida de la monocaprina tras su disolución en agua. Estas disoluciones de prueba diluidas se agitan con vórtex justo antes de someterse a prueba, antes de que las mezclas turbias experimenten separación de fases.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se ha determinado que monocaprina solubilizada en un disolvente miscible en agua adecuado puede dispersarse en agua de manera que forma emulsiones de lípido en agua que son sorprendentemente estables y siguen siendo fuertemente microbicidas durante al menos 12 meses, o bien sin diluirse o bien tras diluirse hasta 200 veces en agua o una disolución acuosa, por ejemplo una disolución acidificada. Las emulsiones son igualmente estables y microbicidas contengan o no pequeñas cantidades de un agente emulsionante, tal como un éster de ácido graso de polioxietilensorbitano (polisorbato), además del lípido microbicida. Se muestra que emulsiones de lípido en agua de la invención que contienen monocaprina como agente microbicida destruyen *Campylobacter* sorprendentemente rápido y en gran número en agua contaminada, en la que el recuento bacteriano viable se reduce en más de un millón de veces en 1 minuto. Las emulsiones de monocaprina 1) pueden añadirse al agua potable de aves de corral (por ejemplo pollos) en concentraciones que desinfectan el agua y previenen la infección por *C. jejuni* y no tienen ningún efecto adverso sobre los animales, 2) reducen

significativamente los recuentos bacterianos en excrementos e hisopos cloacales de aves de corral infectadas con *Campylobacter* cuando se añaden a su agua potable y pienso, 3) reducen significativamente los recuentos bacterianos en superficies contaminadas con *Campylobacter* tales como sobre la piel de aves de corral crudas y sobre utensilios y tablas para cortar en la cocina, 4) mantienen su actividad bactericida frente a *Campylobacter* en mezclas con jabón líquido comercial, tal como detergente líquido de lavavajillas, 5) destruyen *Salmonella* y *E. coli* en agua a pH 5 o inferior y 6) reducen significativamente el crecimiento de microorganismos de descomposición en partes de canales de aves de corral y otros trozos de carne tras su almacenamiento y prolongan de ese modo su vida útil de almacenamiento.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Resultados del ejemplo 4: Peso medio en gramos de un grupo de 5 pollos tratados con una emulsión de MC 5 mM y PS40 al 0,02% en agua potable y piensos durante 12 días en comparación con un grupo de 5 controles no tratados. Se recibieron los pollos a los 10 días de edad y se comenzó el tratamiento con MC en el día 2.

Figura 2. Del ejemplo 9: Recuentos de bacterias aerobias totales en patas de pollo refrigeradas durante 18 días tras su envasado de rutina. Las patas se envasaron o bien sin tratar, de la manera habitual, o bien tras remojar durante 5 min.: (1) en una emulsión de monocaprina (MC) 5 mM (0,12%) y PS40 al 0,02% diluido en tampón citrato-lactato a pH 4,1 (cuadrados negros) o (2) en sólo tampón (triángulos). Cada punto representa el recuento bacteriano por g para 3 patas.

Descripción detallada de la invención

El término "microbicida" se usa en el presente documento para designar un compuesto que puede destruir virus y/o bacterias de modo que ya no puedan realizar sus funciones vitales básicas tales como replicación. El término "emulsión" usado en el presente documento significa gotitas y/o micelas de un lípido dispersadas en un disolvente (por ejemplo agua o una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua que es el caso en el presente documento) de manera que la fase discontinua (el lípido) no se separe de la fase continua (el agua o la mezcla de disolventes) incluso tras su almacenamiento a temperatura ambiente. Las emulsiones que permanecen esencialmente dispersadas de manera homogénea durante muchos meses se denominan "emulsiones estables". El término "agente emulsionante" significa un compuesto que puede mantener lípidos en una emulsión estable en agua a lo largo de un determinado periodo de tiempo. El término "emulsión de lípido en agua" tal como se usa en el presente documento debe entenderse que incluye mezclas acuosas con del 2 al 30% vol/vol de etanol. Según la invención, se han formulado emulsiones de lípido en agua estables que destruyen *Campylobacter* en gran número (>6 log₁₀ unidades formadoras de colonia) tras ponerse en contacto durante 1 min. Las emulsiones contienen monocaprina como principio activo. La monocaprina es un 1-monoglicérido de ácido cáprico, que es un ácido graso saturado de 10 carbonos. Se ha encontrado por trabajos previos que la monocaprina es muy activa en la destrucción de un amplio espectro de bacterias y virus y se ha mostrado que es extremadamente activa en la destrucción de *C. jejuni*. Si se preparan según los métodos descritos en el ejemplo 1, las emulsiones concentradas de monocaprina en agua son estables a temperatura ambiente durante hasta 12 meses y son activas frente a *C. jejuni* tras una dilución de hasta 1:200 en agua. Las emulsiones concentradas tienen una concentración de monocaprina en el intervalo de aproximadamente 50 a 300 mM, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 100-300 mM, incluyendo el intervalo de aproximadamente 150 a 300 mM, tal como en el intervalo de aproximadamente 200-300 mM. Es una parte de la invención usar opcionalmente agentes emulsionantes para ayudar a mantener la monocaprina en una emulsión estable en agua. Se prefiere usar ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano (que también se denominan polisorbatos) como agentes emulsionantes. Los polisorbatos son tensioactivos no iónicos que se usan comúnmente en la industria alimentaria como agentes emulsionantes de aceite en agua en concentraciones que varían desde el 0,1 hasta el 1,0 por ciento (p/p). También se usan ampliamente en formulaciones farmacéuticas orales, parenterales y tópicas así como en cosméticos y se consideran generalmente materiales no tóxicos y no irritantes. La Organización Mundial de la Salud ha fijado una ingesta diaria aceptable estimada para los polisorbatos 20, 40, 60, 65 y 80, calculada como ésteres de polisorbato totales, en hasta 25 mg/kg de peso corporal (FAO/WHO. Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications: seventeenth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Tech Rep Ser World Health Org 1974; n.º 539). Los polisorbatos 20, 40, 60, 65 y 80 se aceptan como aditivos de alimentos en Europa (documento E432-E436). Está dentro del alcance de la invención usar polisorbatos seleccionados de los grupos anteriores 20, 40, 60, 65 y 80 como agentes emulsionantes para ayudar a mantener la monocaprina en una emulsión estable en agua. También está dentro del alcance de la invención usar una combinación de agentes emulsionantes para aumentar la estabilidad y/o durabilidad de emulsiones de monocaprina, sin reducir la actividad microbicida de la monocaprina.

Lo siguiente es una descripción detallada de una realización preferida de la fabricación de una emulsión concentrada de monocaprina en agua de la invención y la dilución del concentrado para obtener emulsiones microbicidas diluidas activas usadas para la desinfección de *Campylobacter* y otras bacterias y virus que son susceptibles a la actividad microbicida de la monocaprina. Se calienta agua o una disolución acuosa, por ejemplo agua del grifo normal, en un recipiente adecuado hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30°C a 80°C, tal como en el intervalo de aproximadamente 50-80°C y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 50-70°C, y más preferiblemente en el intervalo de 60°C a 70°C, y se añade lentamente al agua una disolución de monocaprina en un

intervalo de concentración tal como 0,25-2,5 M, y preferiblemente en el intervalo de 0,5-2,5 M o en el intervalo de 1,0-2,0 M, tal como preferiblemente 0,5 ó 1,0 M, en etanol, con agitación enérgica para preparar una emulsión de una concentración de monocaprina final de 50 mM a 300 mM. En consecuencia, dependiendo de la concentración inicial de la monocaprina solubilizada en un disolvente dentro del intervalo preferido anterior de aproximadamente 0,25-2,5 M, la concentración de etanol en la emulsión concentrada estará en el intervalo del 1-30% (vol/vol) con el fin de obtener una concentración deseada de monocaprina. Preferiblemente, la cantidad del disolvente está en el intervalo de aproximadamente el 2,5-30%, tal como en el intervalo de aproximadamente el 2,5-20%, incluyendo aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15% o aproximadamente el 20%. La emulsión se enfría lentamente hasta temperatura ambiente (generalmente en el intervalo de 20-27°C) a la que se vuelve transparente. Las emulsiones permanecen transparentes durante al menos 12 meses a temperatura ambiente y son completamente microbicidas, por ejemplo destruyen $>6 \log_{10}$ unidades formadoras de colonia (UFC) de *C. jejuni*, tras su dilución en agua del grifo hasta una concentración tan baja como 1 mM (0,025%) y se diluyen preferiblemente hasta una concentración en el intervalo de aproximadamente 1-20 mM y más preferiblemente el intervalo de 1-10 mM, tal como por ejemplo 1, 2, 5 ó 10 mM, dependiendo de la aplicación prevista y de la rapidez con la que deben actuar las emulsiones diluidas. La dilución se realiza preferiblemente a temperatura ambiente en un recipiente adecuado con agitación breve. Las emulsiones diluidas permanecen estables y completamente microbicidas durante varios meses a temperatura ambiente. Generalmente, las emulsiones diluidas contendrán en el intervalo de aproximadamente el 0,04-1,5% vol/vol etanol y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,04-0,2% tal como en el intervalo de aproximadamente el 0,04-0,1%, por ejemplo aproximadamente el 0,05%, el 0,08% o el 0,1%, o en el intervalo de aproximadamente el 0,1-1,0%, tal como por ejemplo el 0,2%, el 0,4% o el 0,5%. La cantidad de etanol adecuada depende de la aplicación, si por ejemplo la emulsión diluida va a usarse como líquido de bebida, una baja concentración de etanol es claramente ventajosa mientras que esto no es crítico cuando la emulsión diluida se usa para limpieza o enjuague. Puede añadirse un polisorbato a la emulsión concentrada de monocaprina en agua, tal como hasta una concentración de al menos el 2% (v/v). La concentración de polisorbato no es crítica siempre que esté por debajo del límite permisible en productos alimenticios tras la dilución final del concentrado. El polisorbato se añade a la emulsión concentrada de monocaprina en agua con agitación breve y preferiblemente a una temperatura que oscila entre temperatura ambiente y aproximadamente 70°C, pero más preferiblemente a aproximadamente 30°C. Una emulsión concentrada con polisorbato se diluye hasta la concentración deseada de la misma manera que emulsiones sin polisorbato. Opcionalmente, puede añadirse polisorbato a una emulsión de monocaprina en agua que ya se ha diluido en agua del grifo. Está dentro del alcance de la invención diluir emulsiones concentradas de monocaprina en agua, en agua que se ha acidificado hasta un pH inferior a aproximadamente 5,5 y preferiblemente inferior a 5, añadiendo un tampón adecuado al agua, preferiblemente tampón citrato-lactato, aumentando de ese modo la actividad microbida de las emulsiones de monocaprina diluidas frente a bacterias tales como *Salmonella* y *E. coli* (véase el ejemplo 2). Alternativamente, la emulsión diluida puede acidificarse tras su dilución mediante la adición de un agente de tamponamiento.

Según la invención, pueden usarse emulsiones de monocaprina, que contienen opcionalmente al menos un agente emulsionante adicional aceptable como aditivo de alimentos, para la desinfección de patógenos transmitidos por alimentos y transmitidos por agua que pueden provocar gastroenteritis en seres humanos y otros animales, específicamente especies de *Campylobacter*. Los ejemplos de situaciones o entornos en que tales patógenos pueden eliminarse o reducirse su número incluyen agua potable contaminada, por ejemplo el agua potable de aves de corral tales como pollos (véase el ejemplo 3), superficies contaminadas con excrementos en granjas de aves de corral, canales contaminadas en mataderos en los que canales enteras o partes de canales, por ejemplo de aves de corral tales como pollos o patos, pueden sumergirse en una emulsión de monocaprina microbicida (véanse los ejemplos 5 y 6) o hacerse pasar a través de un dispositivo de pulverización que cubre la canal con la emulsión antes que se envase para su comercialización. También está dentro del alcance de la invención usar emulsiones diluidas en tampón a pH por debajo de 5,5 y más preferiblemente por debajo de pH 5 para reducir el número de microorganismos de descomposición en canales o partes de las mismas con el objetivo de prolongar la vida útil de almacenamiento del producto (véase el ejemplo 9).

Ejemplos adicionales de utilización de la invención incluyen la destrucción de patógenos transmitidos por alimentos en la cocina, en plantas de procesamiento de alimentos y sitios de preparación de alimentos (restaurantes, sitios de fabricación de alimentos, etc.) en los que pueden enjuagarse superficies contaminadas con las emulsiones de monocaprina diluidas (véase el ejemplo 7). Pueden usarse dispositivos de enjuague tales como latas de pulverizador que contienen emulsiones de monocaprina para desinfectar utensilios, tablas para cortar, fregaderos, etc., que corren el riesgo de contaminarse con bacterias transmitidas por alimentos. Otro aspecto de la invención es el uso de emulsiones de monocaprina como aditivo para agua potable y pienso de animales infectados con bacterias intestinales, tales como *Campylobacter*, con el objetivo de reducir el número de bacterias en la mucosa intestinal y en excrementos y disminuir de ese modo el riesgo de contaminación de las canales durante el procesamiento (véase el ejemplo 4). Esta utilización puede extenderse al tratamiento de otras infecciones bacterianas o protozoarias en el tubo digestivo de animales así como en seres humanos, tales como infección con *Helicobacter pylori*. Tal como muestran los ejemplos adjuntos, las emulsiones concentradas de la invención pueden diluirse hasta aproximadamente 1 mM y usarse como líquido de bebida para animales. La concentración de monocaprina en el agua potable está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1-10 mM y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1-5 mM, tal como aproximadamente 1 mM o 2 mM. Puede ser necesaria una concentración superior para obtener un efecto deseado cuando se añade la emulsión al pienso, por ejemplo en el

intervalo de aproximadamente 5-10 mmol de monocaprina por kg de pienso, tal como aproximadamente 5 mM o aproximadamente 10 mM, o incluso superior tal como en el intervalo de 5-25 mmol por kg, por ejemplo 10, 15 ó 20 mmol por kg. Un aspecto importante de la invención es la actividad extremadamente alta de las emulsiones de monocaprina que destruyen millones de bacterias patógenas tales como *Campylobacter* en el plazo de 1 min. Sin embargo, si se desean concentraciones inferiores de monocaprina, por ejemplo en agua potable, pueden diluirse adicionalmente emulsiones activas en 1 min. y dejar que actúen durante más tiempo, por ejemplo durante 10 min. o más, con el fin de obtener una reducción mayor de 6 log₁₀ en el recuento de *Campylobacter* viables. Esto se basa en el hallazgo de que dentro de determinados límites existe una relación inversa entre la concentración de un lípido microbicida y el tiempo que tarda en destruir las bacterias.

Un aspecto importante de la invención proporciona un método para preparar emulsiones concentradas de monocaprina de manera que son estables durante muchos meses a temperatura ambiente y son completamente microbicidas tras su dilución en agua del grifo. Se encontró que el mismo método no es satisfactorio en la preparación de concentrados estables de otros lípidos microbicidas, o bien ácidos grasos o bien monoglicéridos. Los inventores han proporcionado ensayos adecuados que permiten a un experto en la técnica someter a prueba la actividad microbicida de emulsiones, o bien solas o bien como aditivos en otros productos, frente a microorganismos tales como bacterias y virus.

Se describe además en el presente documento el uso de emulsiones o disoluciones de monocaprina como aditivos desinfectantes en detergentes, tales como detergentes líquidos de lavavajillas, y otros detergentes domésticos o industriales suaves (por ejemplo en la industria alimentaria tal como sitios de preparación de alimentos, sitios de procesamiento de alimentos, restaurantes, etc.) así como en productos cosméticos. Por tanto, se ha demostrado que emulsiones y disoluciones concentradas de monocaprina descritas anteriormente pueden mezclarse con una variedad de detergentes líquidos de lavavajillas comerciales de diferente marcas confiriéndoles actividad bacteriana frente a *Campylobacter* tras la dilución de la mezcla de detergente y monocaprina en agua del grifo (véase el ejemplo 8). Este aspecto de la invención proporciona el uso de monocaprina como agente antibacteriano en detergentes líquidos domésticos y productos relacionados. Tal como ilustra el ejemplo 8 adjunto, se mostró que detergentes para el lavado de platos a mano convencionales presentan una buena actividad antibacteriana cuando se mezclan con monocaprina y se diluyen hasta una dilución de aplicación común.

La invención se ilustra con los ejemplos a continuación que no deben considerarse como limitativos del alcance general de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1. Preparación de emulsiones concentradas de monocaprina (MC) en agua con o sin adición de polisorbato 40 (PS40)

Se calentó agua del grifo estéril (250 ml) en un vaso de precipitados de 500 ml hasta 65°C y se añadió lentamente una disolución 1 M de MC (monocaprato de glicerol con emulsionante TS-PH 003, de calidad farmacéutica, de Danisco, Copenhague, Dinamarca), en etanol (Merck) al agua con agitación magnética a la velocidad máxima hasta una concentración de MC final de 200 mM. Se dejó enfriar la emulsión turbia a temperatura ambiente. Se volvió transparente a aproximadamente 27°C y permaneció transparente durante su almacenamiento a temperatura ambiente durante hasta 12 meses. Alternativamente, se añadió un 10% (v/v) de polisorbato 40 (PS40) en agua a la emulsión a 30°C con una agitación magnética breve hasta una concentración final del 0,8% (v/v). La emulsión se volvió inmediatamente transparente tras la adición del polisorbato y permaneció transparente durante al menos 12 meses a temperatura ambiente. Se diluyeron emulsiones concentradas de MC con o sin PS40 en agua hasta la concentración deseada con una agitación magnética breve y se sometió a prueba para determinar su actividad microbicida frente a *C. jejuni*. Las emulsiones concentradas transparentes se volvieron ligeramente turbias tras su dilución pero las emulsiones diluidas permanecieron estables (sin precipitación de cristales) y activas durante muchos meses.

Se sometieron a prueba las emulsiones diluidas frente a *C. jejuni* de la siguiente manera: Se inocularon placas de agar de sangre con *Campylobacter* y se incubaron durante 2 días en una jarra de gas con una atmósfera microaerobia (kit generador de gas, *Campylobacter* System BR 060A, Oxoid Ltd) a 37°C. Se recogieron placas que mostraban abundante crecimiento bacteriano, se recogieron las bacterias con un hisopo de algodón y se suspendieron en agua del grifo estéril. Se dispuso la suspensión de *Campylobacter* a tubos de ensayo y se mezcló con una cantidad igual de emulsión diluida. Se usaron suspensiones de *Campylobacter* mezcladas con agua como controles. Se incubaron las mezclas durante o bien 1 o bien 10 min. a temperatura ambiente y se contaron entonces *Campylobacter* viables haciendo diluciones de 10 veces en solución salina estéril (NaCl al 0,9%) y sembrando en estrías 10 µl de las diluciones de 10⁻² a 10⁻⁶ y 100 µl de la dilución de 10⁻¹ en placas de agar de sangre con una punta de pipeta. Se contaron las colonias bacterianas tras la incubación de las placas durante 2 días en una atmósfera microaerobia, tal como se describió. Se restaron los recuentos viables (log₁₀ unidades formadoras de colonia, UFC) de bacterias mezcladas con emulsión del recuento bacteriano (UFC) del control de agua y se usó la diferencia como una medida de las actividades microbicidas de la emulsión. La tabla 1 muestra las actividades anti-*Campylobacter* de emulsiones con o sin polisorbato tras su almacenamiento durante diversos periodos de tiempo.

Se han sometido a prueba emulsiones de monocaprina diluidas en agua y se encontró que son activas frente a al menos 20 cepas de *C. jejuni* aisladas de la piel o los excrementos de pollos, patos y pavos y frente a 10 cepas aisladas de pacientes con campilobacteriosis de diversos países en Europa, Asia y África. Además, se encontró que *C. coli* y *C. lari*, 2 cepas de cada una, eran susceptibles a la actividad microbicida de emulsiones de monocaprina.

Tabla 1. Actividades anti-*Campylobacter* de diluciones de emulsiones concentradas de monocaprina (MC) con o sin polisorbato 40 (PS40) almacenadas a temperatura ambiente durante periodos de tiempo variables.

Emulsión concentrada	Meses de almacenamiento	Concentración (mM) tras la dilución ¹	Reducción del recuento bacteriano (log ₁₀ UFC) ²
MC 200 mM	12	1,25 ³	≥6,5 ⁴
MC 200 mM	9,5	1,25	≥6,8 ⁵
MC 200 mM	9	1,25	≥6,8 ⁵
MC 200 mM	7,5	1,25	6,2 ⁵
MC 200 mM	6,5	1,25	≥6,8 ⁵
MC 200 mM	4,5	1,25	≥6,8 ⁵
MC 200 mM	1,5	1,25	≥6,2 ⁵
MC 200 mM	2	1,0 ⁶	≥6,2 ⁵
MC 200 mM/PS40 al 0,8%	27	1,25/0,005% ⁷	≥6,5 ⁴
MC 200 mM/PS40 al 0,8%	17	1,25/0,005%	≥6,5 ⁴
MC 200 mM/PS40 al 0,8%	12,5	1,25/0,005%	≥6,8 ⁵
MC 200 mM/PS40 al 0,8%	12	1,25/0,005%	≥6,5 ⁴
MC 200 mM/PS40 al 0,8%	7	1,25/0,005%	≥6,2 ⁵
MC 200 mM/PS40 al 0,8%	7	1,0/0,004% ^{6,7}	≥6,2 ⁴

¹ Concentración final tras la adición de *Campylobacter* (1:1)

² En comparación con UFC (unidades formadoras de colonia) de *Campylobacter* mezcladas 1:1 con agua del grifo estéril.

³ Dilución de 160 veces. MC al 0,03%/1,25 mM

⁴ *Campylobacter* tratada durante 10 min. a temperatura ambiente.

⁵ *Campylobacter* tratada durante 1 min. a temperatura ambiente

⁶ Dilución de 200 veces. MC al 0,024%/1,0 mM

⁷ Porcentaje de PS40

EJEMPLO 2. Efecto de emulsiones acidificadas de MC y PS40 sobre *Salmonella* y *E. coli*.

Se acidificó agua del grifo estéril mediante la adición de tampón citrato-lactato (ácido láctico-citrato de trisodio 0,06 M) y se ajustó a pH 5,5, 5,0, 4,5 y 4,1. Se diluyó una emulsión 200 mM de MC y PS40 al 0,8% en el tampón hasta una concentración de MC 2,5 mM y PS40 al 0,01%, pH 4,1, 4,5, 5,0 y 5,5, o MC 10 mM y PS40 al 0,04%, pH 5,0 y 5,5 y se incubó a 37°C durante 10 minutos o bien con *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium* o bien con la cepa 0157 de *Escherichia coli* y un aislado clínico de *E. coli* de una muestra de orina. Se sometieron a prueba las actividades de las emulsiones a pH neutro sin tampón como controles. Se inocularon diluciones decimales sobre placas de agar de sangre y se incubaron en un incubador humidificado a 37°C durante 24 h. La reducción en el recuento de células viables de las bacterias se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de emulsiones de MC y PS40 a diferente pH frente a *Salmonella* y *E. coli*.

Concentración de MC/PS40 ³	pH	Reducción de UFC log 10 ^{1,2}	
		<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>
1,25 mM/0,005%	4,1	≥ 7,0 ± ND	≥ 6,7 ± ND
1,25 mM/0,005%	4,5	≥ 7,0 ± ND	≥ 6,7 ± ND
1,25 mM/0,005%	5,0	6,60 ± 0,84	≥ 6,7 ± ND
1,25 mM/0,005%)	5,5	1,90 ± 0,14	2,06 ± 0,07
5 mM/0,02%)	5,5	0,78 ± 0,63	2,43 ± 0,13
5 mM/0,02% ⁴	7,2	0,30 ± 0,17	0,98 ± 0,19
Control de ácido ⁶	4,1	0,13 ± 0,06	0/0

¹ En comparación con UFC de bacterias mezcladas 1:1 con agua del grifo estéril.

² Media ± desviación estándar de al menos 4 determinaciones de 2 diferentes cepas de cada bacteria. ND: no disponible.

³ Concentración tras la adición de bacterias (1:1)

⁴ En agua del grifo sin tampón.

⁵ No realizado

⁶ Tampón sin MC ni PS40

Tanto *Salmonella spp* como *E. coli* se destruyen eficazmente por MC 1,25 mM a pH 4,1 y 4,5 pero no a pH 4,1 sin MC. *E. coli* se destruye eficazmente por MC 1,25 mM a pH 5 y *Salmonella* en menor grado por MC 1,25 mM y 5 mM a pH 5. Se encontró una pequeña actividad frente a *E. coli* a pH 5,5. Aparentemente, hay un efecto sinérgico de MC y ácido sobre todas esas bacterias.

EJEMPLO 3. Eliminación de *C. jejuni* en agua potable de pollos.

Se dividieron pollos de engorde de dieciséis días de edad, libres de infección por *Campylobacter* natural, en 2 grupos bien separados de 5 pollos cada uno. Se inoculó por la boca cada pollo en el grupo control con 5 log₁₀ UFC de *C. jejuni* (aislada de excrementos de pollos) en 100 µl de agua del grifo. Se inoculó el grupo experimental de la misma manera excepto porque se añadió una emulsión concentrada de MC en agua al inóculo hasta una concentración final de 2,5 mM (0,06%), 10 minutos antes de administrarse a los pollos. Se les dio a los pollos pienso y agua a voluntad durante 8 días y entonces se sacrificaron y se tomaron muestras de los ciegos para determinar el recuento de *Campylobacter*. No pudo detectarse *Campylobacter* en los ciegos del grupo experimental, mientras que los pollos en el grupo control, que recibieron el agua no tratada, estaban todos fuertemente colonizados con *Campylobacter*, conteniendo sus ciegos 6,5 log₁₀ UFC por g. Por tanto, puede desinfectarse agua potable contaminada con *C. jejuni* (6 log₁₀ UFC por ml) mediante la adición de emulsión de MC de modo que no provoca infección intestinal de pollos.

EJEMPLO 4. Reducción de infección por *Campylobacter* en animales de engorde colonizados de manera natural tratados con emulsión de MC en agua potable y pienso.

Se recibieron diez animales de engorde de 36 días de edad de una manda positiva para *Campylobacter* en el momento del sacrificio y se dividieron en 2 grupos, de 5 aves en cada uno. Al día siguiente, se recogieron hisopos cloacales de ambos grupos para someter a prueba *Campylobacter* y se inició entonces el tratamiento en un grupo con MC 10 mM y PS40 al 0,04% añadidos al agua potable y pienso. El otro grupo sirvió como control no tratado. Se continuó el tratamiento durante 3 días tras los que se recogieron muestras cloacales y se sacrificaron las aves. La tabla 3 muestra los resultados de 2 experimentos. Un análisis mediante ANOVA mostró que había una diferencia significativa en los recuentos de *Campylobacter* para los grupos experimental y control tras tratamiento durante 3 días y una diferencia significativa en los recuentos para el grupo experimental antes y después del tratamiento, mientras que no había diferencia en los recuentos para el grupo control.

Se realizó un experimento similar en el que se infectaron artificialmente pollos de 21 días de edad con *Campylobacter* mediante contacto con aves inoculadas alojadas en la misma jaula. Se les administró MC 5 mM y PS40 al 0,02% en su agua potable y pienso durante 10 días, comenzando en el día 0, y se sometieron a prueba hisopos cloacales para determinar *Campylobacter* cada de 2 a 5 días. Se redujeron significativamente los recuentos de *Campylobacter* en los hisopos cloacales tras 2-10 días de tratamiento (tabla 4).

La adición de una emulsión de MC 5 mM y PS40 al 0,02% al agua potable y pienso de pollos de 12-15 días de edad durante al menos 12 días no tuvo ningún efecto sobre su tasa de crecimiento (figura 1) y no se observaron anomalías en sus tubos digestivos o hígados mediante examen macro y microscópico. Se repitió este experimento 3 veces con los mismos resultados.

Tabla 3. Recuentos de *Campylobacter* en hisopos cloacales de pollos infectados de manera natural con *Campylobacter* y tratados durante 3 días con una emulsión de MC 10 mM (0,24%) y PS40 al 0,04% añadida a su agua potable y pienso.

Experimento	Día	Recuentos de <i>Campylobacter</i> viables (log ₁₀ UFC/ml) ¹	
		Grupo tratado	Grupo control
1	0	7,2 ± 0,4	6,6 ± 1,0
	3	5,4 ± 1,3 ²	6,9 ± 0,3
2	0	4,7 ± 0,8	5,1 ± 0,2
	3	3,2 ± 0,3 ³	5,4 ± 0,3

¹ Media para 5 hisopos cloacales ± desviación estándar.

² Significativamente (P<0,05) menor que el grupo control en el día 3 y significativamente (P<0,05) menor que el grupo tratado antes del comienzo del tratamiento en el día 0.

³ Significativamente (P<0,01) menor que el grupo control en el día 3 y significativamente (P<0,05) menor que el grupo tratado antes del comienzo del tratamiento en el día 0.

Análisis mediante ANOVA.

Tabla 4. Recuentos de *Campylobacter* en hisopos cloacales de un grupo de 7 pollos infectados con *C. jejuni* y tratados con una emulsión de monocaprina 5 mM (0,12%) y PS40 al 0,02% en agua potable y pienso durante 10 días. Se usó como control un grupo de 7 pollos no tratados.

Días ²	Recuentos bacterianos viables (log ₁₀ UFC/ml) ¹	
	Grupo tratado ³	Grupo control ³
2	4,7 ± 0,5 ⁴	6,8 ± 0,5
5	5,3 ± 0,5 ⁵	6,5 ± 0,3
10	5,1 ± 0,6 ⁵	6,5 ± 0,7

¹ Media ± desviación estándar.

² Días tras el contacto entre 2 pollos infectados y 5 no infectados

³ Los 7 pollos, 2 inoculados por la boca y 5 infectados por contacto en el día 0, cuando se inició el tratamiento.

⁴ Significativamente menor que el grupo control (P<0,01).

⁵ Significativamente menor que el grupo control (P<0,05).

Análisis mediante ANOVA

EJEMPLO 5. Reducción en los recuentos de *Campylobacter* viables en patas de pollo contaminadas de manera natural por inmersión en emulsión de MC.

5 Se obtuvieron patas de pollo contaminadas con *Campylobacter* inmediatamente tras el sacrificio. Procedían de una manada de pollos infectados de manera natural en la batería de engorde. Se pesaron y se dividieron en 3 grupos de 3 patas cada uno. Se sumergió el grupo 1 en 1 l de emulsión de MC 10 mM (0,24%) con PS40 al 0,04% en agua del grifo durante 10 min. a temperatura ambiente, se sumergió el grupo 2 en agua sola y el grupo 3 no se trató. Se drenó cada pata durante 30 s, se transfirieron a bolsas de plástico con 20 ml de solución salina estéril y se masajearon durante 1 min. Se sometió a prueba entonces una muestra de la solución salina para detectar *Campylobacter* mediante inoculación de diluciones decimales sobre placas Campy-Cefex (Stern, N. J., B. Wojton, y K. Kwiatek. 1992. A differential-selective medium and dry ice-generated atmosphere for recovery of *Campylobacter jejuni*. J. Food Prot. 55:514-517). Se incubaron las placas durante 48 h a 37°C en una jarra de gas con una atmósfera microaerobia, tal como se describió anteriormente. Se contaron entonces las colonias y se calculó el número de *Campylobacter* viables (log₁₀ unidades formadoras de colonia, UFC) por gramo de pata. La tabla 5 muestra los resultados de 4 experimentos diferentes. Había una variación considerable entre las 3 patas en cada grupo, tratadas simultáneamente en la misma emulsión. Sin embargo, un análisis de los 4 experimentos mediante ANOVA de dos vías mostró que había una reducción significativa (P<0,05) en el número de *Campylobacter* viables en patas tratadas con emulsión de MC en comparación con patas sumergidas en agua del grifo y con patas no tratadas.

Tabla 5. Reducción en los recuentos de *Campylobacter* viables en patas de pollo contaminadas de manera natural tras inmersión en una emulsión de MC durante 10 min. a temperatura ambiente.

Experimento	Número de <i>Campylobacter</i> viables ¹ (log UFC) por g de pata		
	Emulsiones de MC ²	Agua del grifo	No tratadas
1.	0,54 ± 0,54 ³	1,68 ± 1,06	2,05 ± 0,43
2.	1,50 ± 0,41	2,97 ± 0,58	2,80 ± 0,13
3.	0,37 ± 0,64	1,63 ± 0,23	1,62 ± 1,22
4.	0,80 ± 0,25	2,40 ± 0,73	2,27 ± 0,25

¹ Media para 3 patas ± desviación estándar

² Monocaprina diez mM (0,24%) y polisorbato 40 al 0,04% en agua del grifo.

³ un análisis estadístico de los 4 experimentos mediante ANOVA de dos vías mostró significativamente menos bacterias en patas tratadas con MC que en patas no tratadas y en patas enjuagadas en agua del grifo (P<0,05)

25 El tratamiento de patas de pollo contaminadas artificialmente con *C. jejuni* mostró resultados similares, es decir, aproximadamente una reducción de 1,5 log₁₀ en UFC tras la inmersión en emulsiones de MC. Variables como temperatura y duración del tratamiento, concentración y acidez de las emulsiones o adición de PS40 no tuvieron un efecto significativo sobre la reducción.

30 **EJEMPLO 6.** Reducción en los recuentos de *Campylobacter* viables en patas contaminadas de patos por inmersión en emulsión de MC.

35 Se obtuvieron patas de patos Pekín contaminadas de manera natural con *Campylobacter* unas pocas horas tras el sacrificio. Se pesaron y se dividieron en 3 grupos de 3 patas cada uno. Se sumergió el grupo 1 en 1 litro de emulsión de MC 10 mM (0,24%) con PS40 al 0,04% en agua del grifo durante 10 min. a temperatura ambiente, se sumergió el grupo 2 en agua sola y el grupo 3 no se trató. Se drenó cada pata durante 30 s, se transfirieron a una bolsa plástica con 20 ml de solución salina y se masajéo durante 1 min. Se inocularon muestras de la solución salina en diluciones decimales sobre placas Campy-Cefex. Se incubaron las placas durante 48 h a 37°C, tal como se describió. Se contaron las colonias de *Campylobacter* y se calculó el número de bacterias viables (log₁₀ unidades formadoras de colonia, UFC) por gramo de pata. La tabla 6 muestra los resultados de 2 experimentos. Había una reducción

significativa en el número de *Campylobacter* viables en patas tratadas con emulsión de MC en comparación con patas tratadas con agua del grifo y no tratadas.

5 **Tabla 6.** Reducción en los recuentos de *Campylobacter* en patas de pato frescas tras la inmersión en una emulsión de MC durante 10 min. a temperatura ambiente.

Experimento	Número de <i>Campylobacter</i> viables ¹ (log UFC) por g de pata		
	Emulsión de MC ²	Agua del grifo	No tratadas
1	0,24 ± 0,03 ³	1,63 ± 0,27	2,03 ± 0,32
2	0,58 ± 0,42 ⁴	2,34 ± 0,38	2,40 ± 0,28

¹ Media para 3 patas ± desviación estándar
² Monocaprina diez mM (0,24%) y polisorbato 40 al 0,04% en agua del grifo.
³ Significativamente menos *Campylobacter* que en patas no tratadas (P<0,01) y en patas enjuagadas en agua del grifo (P<0,05). Análisis mediante ANOVA
⁴ Significativamente menos *Campylobacter* que en patas no tratadas y en patas enjuagadas en agua del grifo (P<0,05). Análisis mediante ANOVA

10 **EJEMPLO 7.** Desinfección de superficie de plástico y madera contaminada con *Campylobacter* mediante tratamiento con emulsiones de MC.

10 Se dividieron tablas para cortar de plástico y madera en 4 cuadrados iguales (15x10 cm) y se contaminó cada cuadrado con 1 ml de fluido (jugo) con adiciones conocidas de *Campylobacter* de partes de pollos frescas, alas o patas. El fluido, que contenía restos de tejidos, se había mezclado meticulosamente con una suspensión de *Campylobacter* hasta una concentración de 5,6 ± 0,2 log₁₀ UFC/ml, antes de extenderse sobre la superficie de la tabla para cortar. Se añadió una emulsión de MC 10 mM (0,25%) y PS40 al 0,04% en agua del grifo al cuadrado uno, una emulsión de MC 10 mM y PS40 al 0,04% en detergente líquido de lavavajillas convencional al 1,25% (WUL, "washing-up liquid") obtenido de un supermercado al cuadrado 2, WUL al 5% en agua del grifo al cuadrado 3 y agua del grifo estéril al cuadrado 4. Se añadieron 2 ml a cada cuadrado, se mezclaron meticulosamente con el fluido contaminado y se dejaron durante 2 min. Se secó entonces el enjuague de fluido en cada cuadrado con una toallita de papel (25x10 cm) y se empapó en 10 ml de solución salina estéril que se inoculó en diluciones decimales sobre placas Campy-Cefex y se incubaron durante 48 h a 37°C en una jarra de gas con una atmósfera microaerobia. Se tomaron cuidadosamente muestras usando hisopos de los cuadrados con hisopos de algodón que se agitaron con vórtex en un ml de solución salina y se inocularon en diluciones decimales sobre placas Campy-Cefex, tal como se describió. Se contaron las colonias de *Campylobacter* tras 2 días. Los resultados se muestran en la tabla 7. Se redujo significativamente (P<0,01) el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en los fluidos de enjuague de los cuadrados 1 y 2 enjuagados con emulsiones de MC, o bien en agua (cuadrado 1) o bien en una disolución al 1,25% de WUL (cuadrado 2). También se redujo significativamente el número de UFC en hisopos de algodón de estos cuadrados (1b y 2b) en comparación con hisopos de los cuadrados enjuagados con agua del grifo sola, aunque el enjuague de las tablas de madera fue algo menos eficaz (P<0,05) que el de las tablas de plástico (P<0,01). Notablemente, el agua que contenía WUL al 5%, que contenía tensoactivos aniónicos al 5-15%, no redujo los recuentos de *Campylobacter* más que el agua del grifo.

25 **Tabla 7.** Desinfección de tablas para cortar de plástico y madera contaminadas con fluido con adiciones conocidas de *Campylobacter* de partes de pollos frescas. Se enjuagaron superficies contaminadas durante 2 min. con 1) emulsión 10 mM (0,24%) de monocaprina (MC) en agua del grifo que contenía polisorbato 40 (PS40) al 0,04% (cuadrado 1), 2) MC 10 mM y PS40 al 0,04% en jabón líquido de lavavajillas al 1,25% en agua del grifo (cuadrado 2), 3) jabón líquido de lavavajillas al 5% en agua del grifo (cuadrado 3) y 4) agua del grifo (cuadrado 4).

Cuadrado n.º	Número de <i>Campylobacter</i> viables (log ₁₀ UFC/ml) ¹	
	Tabla de plástico	Tabla de madera
1a. Fluido de enjuague (MC y PS40 en agua)	1,13 ± 0,25 ²	1,95 ± 0,31 ²
1b. Hisopo de algodón	< 1,00 6 ND ³	1,45 ± 0,37 ⁴
2a. Fluido de enjuague (MC y PS40 en WUL)	1,38 ± 0,48 ²	2,35 ± 0,71 ²
2b. Hisopo de algodón	< 1,00 ± ND ³	1,55 ± 0,53 ⁴
3a. Fluido de enjuague (WUL al 5% en agua)	5,18 ± 0,38	4,50 ± 0,85
3b. Hisopo de algodón	4,40 ± 0,39	3,50 ± 0,66
4a. Fluido de enjuague (agua del grifo)	5,13 ± 0,26	4,80 ± 0,52
4b. Hisopo de algodón	4,25 ± 0,31	3,70 ± 0,54

¹Media de 4 experimentos ± desviación estándar

²Reducción significativa de UFC en fluido de enjuague de MC en comparación con enjuague con agua del grifo (P<0,01)

³Reducción significativa de UFC en hisopos de algodón de cuadrados enjuagados con MC en comparación con hisopos de algodón de cuadrados enjuagados con agua del grifo (P<0,01)

⁴Reducción significativa de UFC en hisopos de algodón de cuadrados enjuagados con MC en comparación con hisopos de algodón de cuadrados enjuagados con agua del grifo (P<0,05)

También se desinfectaron eficazmente tablas para cortar de plástico contaminadas con jugo de partes de pollos infectadas de manera natural con *Campylobacter*, enjuagando con emulsiones de MC diluidas o bien en agua del grifo o bien en WUL al 1,25%.

5 EJEMPLO 8. Actividades anti-*Campylobacter* de mezclas de emulsiones o disoluciones de MC y jabones líquidos de lavavajillas comerciales.

10 Se mezclaron quince WUL comerciales de diversas marcas con concentrados 200 mM de MC y PS40 al 0,8%, en la razón de 1 parte de WUL con respecto a 4 partes de emulsión de MC. Los WUL variaban en sus contenidos aniónicos y no iónicos y 6 de ellos contenían componentes antibacterianos. Se diluyeron 16 veces las mezclas en agua del grifo hasta una concentración de MC 10 mM y WUL al 1,25% y se mezclaron con un volumen igual (0,2 ml) de una suspensión de *C. jejuni* durante un min. a temperatura ambiente. Se determinó entonces el número de *Campylobacter* viables mediante inoculación de diluciones decimales de las mezclas sobre placas Campy-Cefex e incubación en una atmósfera microaerobia, tal como se describió. Se diluyeron 20 veces los WUL, sin MC, en agua del grifo hasta una concentración del 5%, se mezclaron con un volumen igual de *C. jejuni* durante 2 min. y se sometieron a prueba de manera similar para determinar el número de *Campylobacter* viables. Los resultados se muestran en la tabla 8.

20 **Tabla 8.** Actividades anti-*Campylobacter* de mezclas de emulsiones de MC y detergentes líquidos de lavavajillas (WUL) comerciales incubadas con *Campylobacter* durante un min. a temp. ambiente. Las concentraciones finales fueron MC 5 mM (0,12%), PS40 al 0,02% y WUL al 1,25% en agua del grifo estéril. Se usaron WUL (5%) como controles y se incubaron con *Campylobacter* durante 2 min. a temp. ambiente.

WUL n.º	% aniónico/no iónico	Reducción en los recuentos de <i>Campylobacter</i> viables (log ₁₀ UFC)
1.	Mezcla de MC-WUL ¹	6,5
	Control de WUL	1,1
2.	Mezcla de MC-WUL ¹	>7,2
	Control de WUL ²	3,2
3.	Mezcla de MC-WUL ¹	>7,2
	Control de WUL	0,6
4.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>6,2
	Control de WUL	1,2
5.	Mezcla de MC-WUL ¹	>7,2
	Control de WUL	0,6
6.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>6,8
	Control de WUL	1,2
7.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>6,8
	Control de WUL	1,0
8.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>6,5
	Control de WUL	0,6
9.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>6,5
	Control de WUL	0,8
10.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>7,1
	Control de WUL	0,9
11.	Mezcla de MC-WUL ¹	>7,1
	Control de WUL	0,8
12.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>7,1
	Control de WUL ²	1,2
13.	Mezcla de MC-WUL ⁵	>7,1
	Control de WUL ²	0,7
14.	Mezcla de MC-WUL ⁴	>7,1
	Control de WUL ²	1,4
15.	Mezcla de MC-WUL ¹	>6,2
	Control de WUL	1,1

¹ La mezcla es turbia y se separa tras su almacenamiento a temp. ambiente

² WUL antibacteriano

³ SI: sin información.

⁴ La mezcla es transparente tras su almacenamiento a temp. ambiente

Aproximadamente la mitad de los WUL sometidos a prueba eran transparentes tras la mezcla con emulsión de MC y permanecieron transparentes y activos frente a *Campylobacter* tras su almacenamiento durante varias semanas a temp. ambiente. Otros WUL se volvieron turbios tras mezclarse con emulsión de MC y se separaron en 2 fases tras su almacenamiento. Sin embargo, pudieron volverse a mezclar mediante agitación y todavía eran activos frente a *Campylobacter* tras su almacenamiento durante algunas semanas. No se conoce el motivo de la diferencia en la solubilidad de MC en las diferentes marcas de WUL y no parece depender de sus contenidos aniónicos/no iónicos. Un WUL (n.º 2) comercializado como antibacteriano mostró una actividad significativa frente a *Campylobacter* tras ponerse en contacto durante 2 min. pero de varios órdenes de magnitud menor que las mezclas de WUL con emulsión de MC. Otros WUL comercializados como antibacterianos (n.º 12, 13, 14) no mostraron más actividad frente a *Campylobacter* tras ponerse en contacto durante 2 min. que WUL no antibacterianos.

Se mezclaron dos WUL (n.ºs 6 y 14) con emulsiones de MC 200 mM en la razón de 1:1 y se encontró que eran activos en una dilución de 10 veces en agua (concentración final MC 5 mM y WUL al 2,5%) cuando se mezclaron con *Campylobacter* durante 2 min. a temp. ambiente, siendo la reducción en los recuentos bacterianos viables $>3,5 \log_{10}$ UFC

En otro tipo de experimento, se mezclaron disoluciones 1 M y 2,5 M de MC en etanol con WUL comerciales en la razón de 1:9, hasta una concentración de MC final de 100 mM y 250 mM, respectivamente, en WUL al 90%. Los WUL permanecieron transparentes o ligeramente turbios tras la adición de la disolución de MC, dependiendo de la marca de WUL. Se diluyeron los WUL 10 veces en agua del grifo hasta concentraciones de 10 mM y 25 mM, respectivamente, y se sometieron a prueba frente a *Campylobacter* durante 2 min. a temp. ambiente, tal como en el experimento anterior. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Actividades anti-*Campylobacter* de mezclas de disoluciones de MC y detergentes líquidos de lavavajillas (WUL) comerciales incubadas con *Campylobacter* durante 2 min. a temp. ambiente. Las concentraciones finales fueron MC 5 mM (0,12%) y 12,5 mM (0,3%), respectivamente, y WUL al 9% en agua del grifo estéril.

WUL n.º	Conc. de MC, mM	Reducción en los recuentos de <i>Campylobacter</i> viables (\log_{10} UFC)
2	5	$\geq 4,9$
2	12,5	$\geq 4,9$
3	5	$\geq 4,9$
3	12,5	$\geq 4,9$
4	5	1,1
4	12,5	3,5
6	5	5,0
15	5	2,1
15	12,5	$\geq 3,9$

Tal como se muestra, todos los WUL son activos con MC en una concentración de 12,5 mM y tres de ellos tienen actividad antibacteriana con una concentración de 5 mM de MC.

EJEMPLO 9. Tratamiento con emulsiones de MC acidificadas para reducir el número de bacterias de descomposición en patas de pollo.

Se obtuvieron patas de pollo en la planta de procesamiento antes de su envasado. Se remojó un grupo de patas en un recipiente con 2 litros de MC 5 mM (0,12%) y PS40 al 0,02% en tampón citrato-lactato 0,06 M a pH 4,1 y 20°C. Tras la inmersión durante 5 min., se retiraron las patas del recipiente, se drenaron durante 30 s y se envasaron en bandejas de plástico, 3 patas en cada bandeja, que se envolvieron en una película Cryovac hermética (BDF750 Cryovac Europe, Sealed Air Corporation S.A.S.). Éste es el método de rutina usado por la planta de procesamiento de aves de corral para envasar partes de pollo para su distribución al por menor. Se trató otro grupo de patas de la misma manera en tampón solo y se envasó el tercer grupo sin tratamiento. Se almacenaron las patas en una sala fría a $3 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Se abrió un envase de cada grupo en los días 0, 2, 4, 7, 10, 14 y 18 y se sometió a prueba para determinar la contaminación bacteriana de la siguiente manera: Se pesaron las patas y se transfirieron a una bolsa de plástico que contenía 50 ml de agua destilada estéril y se masajearon durante 1 minuto para liberar las bacterias de la piel al agua. Se prepararon diluciones decimales del agua en solución salina estéril y se examinaron para determinar los recuentos de colonias aerobias totales (ATC, "aerobic total colony") sembrando en estrías por duplicado sobre agar de recuento en placa (PC-Agar Oxoid CM 325), 100 μl por placa. Se incubaron las placas a 17°C durante 24 h y luego a 7°C durante 3 días, tras lo cual se contaron las colonias. Se muestran los resultados de un experimento en la figura 2. Los recuentos de ATC fueron sistemáticamente inferiores en patas tratadas con emulsión de MC a lo largo de todo el almacenamiento en comparación con o bien controles no tratados o bien controles tratados con tampón. Tras 18 días de almacenamiento, la diferencia en el recuento bacteriano era de aproximadamente 10 veces.

Se repitió el experimento 3 veces con resultados similares.

Discusión y conclusiones

Se ha determinado que es posible fabricar emulsiones concentradas de monocaprina en agua que son sorprendentemente estables y permanecen transparentes tras su almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos 12 meses. Las emulsiones concentradas son microbicidas en una dilución de hasta 200 veces en agua y reducen el número de bacterias viables, tales como *Campylobacter jejuni*, sorprendentemente rápido en agua a temperatura ambiente, provocando al menos una reducción de 6 log₁₀ en unidades formadoras de colonia (UFC) en 1 min. Éste es un aspecto importante de la invención porque es fácil diluir los concentrados en agua del grifo a temperatura ambiente sin agitación vigorosa. Por tanto, las emulsiones de monocaprina pueden fabricarse como concentrados y diluirse para dar las emulsiones de trabajo en el momento y lugar de uso. Los concentrados pueden almacenarse durante al menos 12 meses y las emulsiones diluidas durante al menos 3 meses a temperatura ambiente sin perder su actividad microbicida.

Inesperadamente, pueden prepararse emulsiones concentradas estables de monocaprina en agua sin la adición de un emulsionante. Sin embargo, pueden añadirse emulsionantes tales como polisorbatos a emulsiones de monocaprina sin reducir su estabilidad o actividad microbicida tras la dilución. Otro aspecto de la invención es que las emulsiones concentradas de monocaprina que contienen un polisorbato son estables tras su dilución en agua del grifo tamponada a un pH de menos de 5,5 y preferiblemente en el intervalo de pH de 4 a 5, y que emulsiones concentradas diluidas 160 veces en tampón destruyen bacterias tales como *Salmonella* y *E. coli* que no se destruyen por monocaprina a pH superior.

Los ejemplos notificados en el presente documento muestran que pueden utilizarse de diversas maneras emulsiones de monocaprina en agua, con o sin emulsionantes. Son activas en la destrucción de un patógeno transmitido por alimentos importante, concretamente *C. jejuni*, en agua potable en concentraciones que no son nocivas para pollos, de 12 días de edad y mayores. Es un aspecto importante de la invención que un compuesto natural, monocaprina, clasificado como GRAS, puede usarse para desinfectar agua potable contaminada con *Campylobacter*. También pueden añadirse al agua potable y piensos de pollos en concentraciones que no son nocivas para los animales pero que provocan una reducción en el número de *Campylobacter* en sus intestinos. Otra utilización de la invención es remojar canales de aves de corral en emulsiones de monocaprina para reducir el número de *Campylobacter* en su superficie y reducir de ese modo el riesgo de transmisión de esta bacteria transmitida por alimentos a seres humanos. Un enfoque similar es usar emulsiones de monocaprina diluidas en tampón a pH bajo para reducir el número de microorganismos de descomposición en la superficie de canales o partes de las mismas con el fin de prolongar su vida útil de almacenamiento. Un uso importante de las emulsiones de monocaprina es en la cocina, donde las superficies contaminadas con bacterias transmitidas por alimentos u otras bacterias pueden desinfectarse parcial o completamente mediante inmersión en emulsiones de monocaprina diluidas en agua o en otros medios. Un aspecto importante de la invención es el hallazgo de que disoluciones y emulsiones concentradas de MC pueden mezclarse con una variedad de jabones líquidos comerciales para formar mezclas de jabón-MC estables que son altamente antibacterianas y que pueden almacenarse a temp. ambiente durante al menos varias semanas. Esto abre la posibilidad de fabricación de un nuevo tipo de jabones desinfectantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para fabricar una emulsión concentrada de monocaprina en agua que comprende calentar agua hasta una temperatura en el intervalo de 30 a 80°C, añadir monocaprina solubilizada en alcohol etílico al agua calentada con agitación para preparar una emulsión con una concentración de monocaprina en el intervalo de 50 a 300 mM y que comprende en el intervalo del 1 al 30% (v/v) alcohol etílico y enfriar la emulsión hasta temperatura ambiental a la que forma una emulsión sustancialmente transparente homogénea que permanece estable tras su almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos un año.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua se calienta hasta una temperatura en el intervalo de 60 a 80°C.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua se calienta hasta una temperatura en el intervalo de 60 a 70°C.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la concentración de monocaprina en la emulsión obtenida está en el intervalo de 150-300 mM.
- 25 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1-4, que comprende además añadir un agente emulsionante a la emulsión.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho agente emulsionante se selecciona del grupo de ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano (polisorbatos) en un intervalo de concentración del 0,1 al 5,0% (v/v).
- 35 7. Emulsión homogénea concentrada de monocaprina en agua, que comprende en el intervalo de 50-300 mM monocaprina y en el intervalo del 1-30% (v/v) alcohol etílico, que puede obtenerse mediante el procedimiento según la reivindicación 1.
- 40 8. Emulsión concentrada de monocaprina en agua según la reivindicación 7, que comprende además un agente emulsionante compatible con alimentos.
- 45 9. Emulsión concentrada de monocaprina en agua según la reivindicación 7, en la que dicho agente emulsionante se selecciona del grupo de ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano (polisorbatos) en un intervalo de concentración del 0,1 al 5,0% (v/v).
- 50 10. Emulsión concentrada de monocaprina en agua según la reivindicación 9, en la que el agente emulsionante es polisorbato 40.
- 55 11. Método para desinfectar agua potable y/o pienso contaminados con bacterias patógenas añadiendo al agua o pienso una emulsión concentrada de monocaprina en agua estable que tiene una concentración en el intervalo de 50-300 mM, que puede obtenerse con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 hasta una concentración que destruye eficazmente las bacterias y es segura para el consumo animal.
- 60 12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha emulsión se añade al agua potable hasta una concentración final en el intervalo de 1-10 mM.
13. Método según la reivindicación 11, en el que dicha emulsión se añade al pienso hasta una concentración final que corresponde a 5-10 mmol por kg.
14. Método según la reivindicación 11, en el que dichas bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en especies de *Campylobacter*, *E. coli* y especies de *Salmonella*.
15. Método no terapéutico para reducir el número de bacterias *Campylobacter* en el tubo digestivo de animales añadiendo una emulsión de monocaprina en agua en la concentración en el intervalo de 50-300 mM, que puede obtenerse con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, a su líquido de bebida y/o a su alimento o pienso en una concentración que destruye eficazmente las bacterias y es segura para el consumo animal y humano.
16. Método no terapéutico según la reivindicación 15, en el que dicha emulsión se añade hasta una concentración final en el intervalo de 1-10 mM.
17. Uso de una emulsión de monocaprina que puede obtenerse con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la fabricación de un desinfectante para reducir el número de bacterias patógenas en el tubo digestivo de animales añadiendo dicha emulsión a su líquido de bebida y/o a su alimento o pienso en una concentración que destruye eficazmente las bacterias y es segura para el consumo animal y humano.

18. Uso según la reivindicación 17, en el que dicha emulsión se añade al agua potable hasta una concentración final en el intervalo de 1-10 mM.
- 5 19. Uso según la reivindicación 17, en el que dicha emulsión se añade al pienso hasta una concentración final que corresponde a 5-10 mmol por kg.
20. Uso según la reivindicación 17, en el que dichas bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en especies de *Campylobacter*, *E. coli* y especies de *Salmonella*.
- 10 21. Método para desinfectar una superficie contaminada con bacterias patógenas transmitidas por alimentos con una emulsión concentrada diluida de monocaprina que puede obtenerse con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende diluir dicha emulsión concentrada y aplicarla a dicha superficie contaminada con bacterias patógenas transmitidas por alimentos sumergiendo la superficie en la emulsión microbicida o enjuagándola con la emulsión usando un dispositivo de enjuague apropiado, reduciendo
15 eficazmente de ese modo el número de bacterias viables en la superficie contaminada.
22. Método según la reivindicación 21, en el que la superficie contaminada es de carne cruda, tal como aves de corral crudas, que están tratándose o bien en el matadero, en una cocina o bien en otro sitio de procesamiento de alimentos.
20
23. Método según la reivindicación 21 ó 22, en el que la contaminación está provocada por bacterias seleccionadas del grupo que consiste en especies de *Campylobacter*, especies de *Salmonella* y *E. coli*.
- 25 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que la superficie se selecciona de utensilios, tablas para cortar, fregaderos, encimeras de cocina y otras superficies usadas para el procesamiento de alimentos y la preparación de alimentos que corren el riesgo de contaminarse con dichas bacterias patógenas transmitidas por alimentos.
- 30 25. Método para reducir el número de bacterias de descomposición en productos de carne o pescado y prolongar la vida útil de almacenamiento de tales productos que comprende aplicar una emulsión concentrada diluida de monocaprina, que puede obtenerse con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, a la superficie de dicha productos de carne o pescado mediante inmersión en la emulsión diluida o mediante enjuague con la emulsión diluida usando un dispositivo de enjuague apropiado.
- 35 26. Método según la reivindicación 25, en el que dicha emulsión concentrada se diluye hasta una concentración de monocaprina en el intervalo de 1-10 mM.

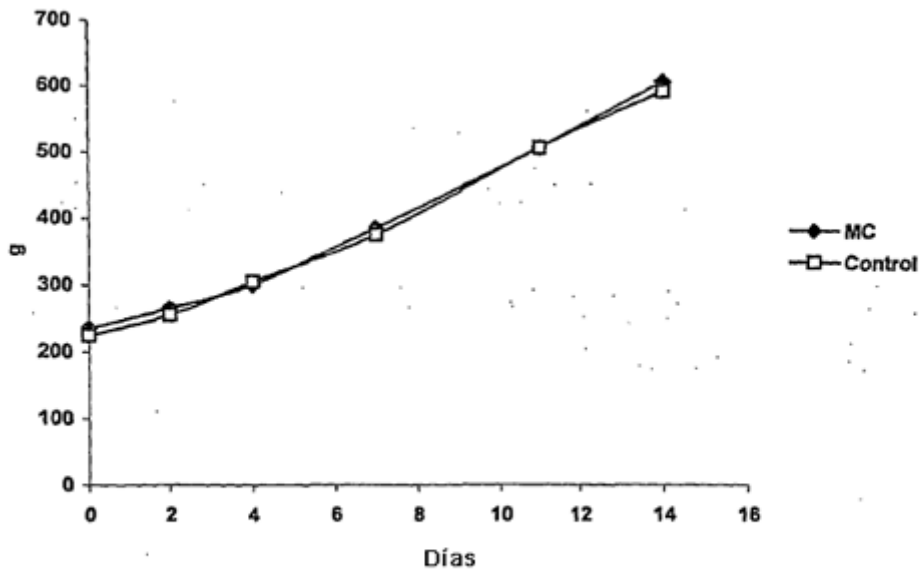


FIG. 1

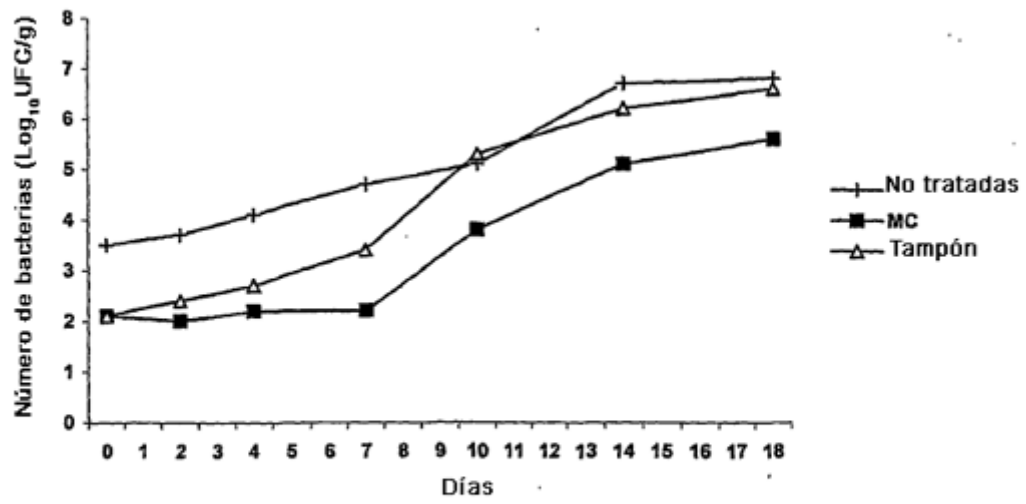


FIG. 2