

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 228**

21 Número de solicitud: 201231482

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/30** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**25.09.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.04.2014**

71 Solicitantes:

**ITRAM HIGIENE S. L. (100.0%)**  
**C/ Miramarges 7, 1º 4ª**  
**08500 Vic (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**SALAS VÁZQUEZ, Dora Isela;**  
**RODRÍGUEZ JEREZ, José Juan;**  
**OSSET HERNÁNDEZ, Miguel;**  
**MONTAÑÉS IZQUIERDO, Vanesa;**  
**FERNÁNDEZ BLANCO, Minerva y**  
**FORNS AGUDO, Isabel**

74 Agente/Representante:

**GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando**

54 Título: **Utilización de una composición con peróxido de hidrógeno para detectar biofilms**

57 Resumen:

Utilización de una composición con peróxido de hidrógeno para detectar biofilms.

La presente invención se refiere a la utilización de una composición con peróxido de hidrógeno para detectar biofilms. Dicha composición comprende además un agente espesante y resulta especialmente adecuada para la detección rápida y eficaz de biofilm in situ, sobre superficies expuestas a contaminación microbiana, por ejemplo en el ámbito de la industria agroalimentaria y en el ámbito farmacéutico y hospitalario. También se refiere a un método para detectar biofilms en el que se emplea dicha composición.

**ES 2 458 228 A1**

## DESCRIPCIÓN

Utilización de una composición con peróxido de hidrógeno para detectar biofilms

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se enmarca en el campo de la higiene de superficies y se refiere a un método para la detección de biofilms mediante el empleo de una composición que comprende peróxido de hidrógeno.

10 **Estado de la técnica anterior**

Un biofilm es un agregado de microorganismos constituido por una población de células creciendo adheridas entre ellas, ancladas a una superficie, e incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (o EPS, del inglés *extracellular polymeric substances*) producidas por el propio biofilm. Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicoicos y nucleicos, y otras sustancias poliméricas hidratadas hasta con un 97% de agua.

El biofilm puede estar constituido de monocultivos de microorganismos, o de diversas especies, así como de una mezcla de fenotipos de una especie dada. La formación de biofilms no está restringida a un grupo específico de microorganismos y hoy en día se considera que en las condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formar biofilms sobre cualquier tipo de superficie.

Las ventajas que aporta un biofilm para la vida de los microorganismos son numerosas, principalmente el disponer de unas condiciones ambientales más estables, una reserva de nutrientes, un punto de anclaje, y mayor resistencia a la desecación. Así mismo, el biofilm también confiere una mayor resistencia a los microorganismos frente a la acción de desinfectantes.

Por lo tanto, en la práctica, un biofilm representa una barrera entre los microorganismos y los desinfectantes, antibióticos o biocidas, tal como se describe en el artículo Bredholt *et al.*, *Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in a low-pressure system*, Eur. Food Res. Technol., 1999, 209 (2), 145-152.

A pesar de que la mayoría de las especies bacterianas tienen la capacidad de formar biofilms, algunos géneros lo forman más fácil y rápidamente que otros, como es el caso de *Pseudomonas*, *Listeria*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. La formación de biofilms no es exclusiva de bacterias, sino que las levaduras también pueden formarlos, como, por ejemplo, el *Saccharomyces cerevisiae*, presente en la industria vinícola

La presencia de biofilms es especialmente indeseable en aquellos ámbitos en los que la higiene constituye un aspecto fundamental, como por ejemplo, en los procesos de fabricación de alimentos y bebidas, o en el ámbito farmacéutico y hospitalario.

Sin embargo, se ha determinado la presencia de biofilms en ámbitos tan diversos como, por ejemplo, a nivel médico, implicados en la patogenia de diversas enfermedades infecciosas y en la formación de placa dental; en hospitales, como contaminantes sobre diversas superficies, particularmente en instrumentos médicos, así como en catéteres, implantes o prótesis; en la industria alimentaria la proliferación de biofilms en las superficies, conducciones y equipos, sobre cualquier tipo de material, supone un riesgo de contaminación del producto acabado, y puede llegar representar un importante problema de salud pública; en diversos sistemas acuáticos, como por ejemplo, en sistemas de refrigeración industrial y conducciones de agua potable; en el ámbito doméstico, principalmente en baños y cocinas; entre otros posibles ejemplos.

En los biofilms presentes en el ambiente hospitalario, suelen predominar las bacterias Gram-positivas, notablemente del género estafilococos, aunque las infecciones debidas a bacterias Gram-negativas y fúngicas suelen ser más serias. Las infecciones fúngicas más comunes suelen ser causadas por especies patogénicas de *Candida*, particularmente *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, como se describe en los artículos Hawser *et al.*, *Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro*, Infection Immunity, 1994, 62 (3), 915-921, y Jabra-Rizk *et al.*, *Fungal biofilms and drug resistance*, Emerging Infect. Dis., 2004, 10 (1), 14-19.

Las especies más relevantes involucradas en la formación de biofilm en el marco de la producción de alimentos y que comprometen particularmente la seguridad alimentaria son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Cronobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Campylobacter jejuni* y *Bacillus spp.*, principalmente, tal como se describe en los artículos Mattila-Sandholm *et al.*, *Biofilm in the industry: A review*, Food Rev. Int., 1992, 8 (4), 573-603, Lee Wong *et al.*, *Biofilm in Food Processing Environments*, J. Dairy Sci., 1998, 81 (10), 2765-2770, y Jo *et al.*, *Maturation and survival of Cronobacter biofilms on silicone, polycarbonate, and stainless steel after UV light and ethanol immersion treatments*, J. Food Protection, 2010, 73 (5), 952-956.

65

Las superficies son una de las vías de contaminación de alimentos más frecuentes, tanto en la industria alimentaria, como en la restauración colectiva, o en el hogar. Las superficies de contacto con alimentos incluyen tanto las que tienen un contacto directo con los mismos, como aquellas desde las cuales existe un vertido sobre el alimento o sobre superficies que contactan el alimento, normalmente durante el curso de las operaciones. También se incluyen utensilios y superficies de los equipos.

Así pues, la industria alimentaria requiere adherirse estrictamente a las normas de higiene establecidas, así como la aplicación rigurosa del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) a lo largo de la cadena alimentaria, tal como se describe en el artículo Panisello *et al.*, *Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems*, Int. J. Food Microbiol., 2000, 59 (3), 221-234.

En este marco, es imprescindible efectuar un control eficaz de la formación de biofilms sobre las superficies de contacto con el alimento, puesto que al desprenderse fragmentos de un biofilm con células viables, éstas pueden dispersarse y actuar como matriz para la fijación de nuevas células que darán lugar a un nuevo biofilm, con la consiguiente recontaminación de las superficies.

Uno de los factores esenciales en la implementación de dichos sistemas de higiene es disponer de un método rápido y efectivo para controlar su efectividad. Es imprescindible, pues, disponer de métodos que tengan una capacidad detectora de biofilms, que actúen como auxiliares para el establecimiento de Puntos Críticos de Control (PCC) en las superficies de la industria agroalimentaria.

En el estado de la técnica son conocidos un buen número de métodos para el estudio y la monitorización de biofilms procedentes de diversos ámbitos, que se basan, por ejemplo, en técnicas como la microscopía de fluorescencia, microscopía de barrido electrónica (SEM, *scanning electron microscopy*), microscopía óptica diferencial de contraste de interferencia (DIC, *differential interference contrast microscopy*), microscopía electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*) o, últimamente, la microscopía de barrido confocal láser (CLSM) en conjunto con el análisis de imagen han contribuido a un mejor entendimiento visual de la arquitectura del biofilm, tanto estática como dinámica, tal como se describe en el artículo Schlapp *et al.*, *Development of 3D architecture of uropathogenic Proteus mirabilis batch culture*, J. Microbiol. Methods, 2011, 87, 234-240.

No obstante, uno de los métodos más utilizados en el estudio y detección de biofilm es el método del cultivo tisular en placas (TCP, *tissue culture plate method*), que se basa en la realización de cultivos en placas y posterior análisis del biofilm formado por técnicas como ELISA, previa fijación y tinción del biofilm, tal como se describe en el artículo Christensen *et al.*, *Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices.*, J. Clin. Microbiol., 1985, 22 (6), 996-1006.

Actualmente, los métodos disponibles para la determinación de biofilm en superficies, por ejemplo, en la industria alimentaria, son los métodos tradicionales y rápidos de control microbiológico. Los métodos tradicionales son el cultivo en placa o métodos de aplicación-impronta (Rodac, slides y Petrifilm) que, aunque fiables y eficientes, requieren al menos de varios días a una semana antes de que los resultados sean obtenidos, por lo que son inapropiados como herramienta de vigilancia rápida para el APPCC.

Los métodos rápidos se agrupan en tres categorías: métodos cualitativos, cuantitativos y de identificación. Aunque los tres dan un resultado "rápido", únicamente el análisis cualitativo permite dar un resultado *in situ* y al momento. Este resultado rápido en la detección del biofilm es una de las premisas más valoradas a nivel industrial, pues permite identificar, contener y recuperarse rápidamente de un episodio de contaminación localizada. Algunos ejemplos de métodos rápidos son: ELISA (inmunológica), Detección de ATP por bioluminiscencia (enzimática), Microscopía de Epifluorescencia Directa (DEM) y PCR en Tiempo Real (biología molecular).

Así mismo, también se han descrito otras metodologías con dicha finalidad, como la utilización de ciertas sustancias que son capaces de teñir selectivamente la matriz polimérica extracelular del biofilm. Así por ejemplo, la solicitud de patente japonesa JP-A-2005210997 se refiere a un método para detectar biofilm en superficies, preferiblemente en el ámbito de la industria alimentaria, con la finalidad de mejorar la limpieza y desinfección de las mismas, y que consiste en la tinción del biofilm con una composición que contiene el colorante *Rojo Monascus*.

En el mercado se encuentran disponibles algunos productos comerciales basados también en la utilización de tintes selectivos de la matriz polimérica del biofilm, como, por ejemplo, el "Biofilm detector kit" comercializado por la empresa Realco y el "Test de detección de Biofilms TBF 300" comercializado por la empresa Betelgeux.

Sin embargo, la mayoría los métodos descritos en el estado de la técnica no resultan adecuados o totalmente satisfactorios para la detección inmediata de biofilms en superficies relativamente grandes, particularmente en la industria agroalimentaria o en el ámbito farmacéutico y hospitalario, y especialmente durante las tareas rutinarias de limpieza y desinfección bien sea por su falta de eficacia en la detección, porque no permiten disponer de resultados de forma rápida, o debido a su coste elevado.

Así pues, es manifiesto que subsiste la necesidad de poder disponer de un método para la detección de biofilm en superficies de todo tipo, especialmente en el ámbito de la industria agroalimentaria o en el ámbito farmacéutico y hospitalario, que sea efectivo en la detección de biofilm de forma rápida y precisa, que sea fácil de utilizar y no requiera de un tipo de instrumentación complejo, que sea aplicable a grandes extensiones de superficies y que resulte económico para favorecer su aplicación generalizada, y permitir así un mejor control de la presencia de biofilm y por lo tanto una mejor vigilancia de la eficacia de los sistemas de higienización, que a su vez permitan aplicar medidas correctoras oportunas en el mismo momento que se efectúan las determinaciones.

### Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es la utilización de una composición con peróxido de hidrógeno para detectar biofilms.

También forma parte del objeto de la presente invención un método para detectar biofilms en el que se emplea dicha composición.

### Descripción de las figuras

#### Figura 1:

En la figura 1 se muestra una fotografía del resultado de la aplicación del método según la presente invención, para la detección de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sobre una superficie de acero inoxidable dispuesta en posición horizontal.

#### Figura 2:

En la figura 2 se muestra una fotografía del resultado de la aplicación del método según la presente invención, para la detección de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sobre una superficie de acero inoxidable dispuesta en posición vertical.

#### Figura 3:

En la figura 3 se muestra una fotografía del resultado de la aplicación del método según la presente invención (imagen izquierda), o tras la aplicación de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (imagen derecha), para la detección de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sobre superficies recubiertas con pintura epoxi, dispuestas en posición horizontal, después de 30 segundos de reacción (3A).

En la figura 3B se muestra una fotografía con las mismas superficies después de 5 minutos de reacción.

En la figura 3C se muestra una fotografía con las mismas superficies después de 15 minutos de reacción.

#### Figura 4:

En la figura 4 se muestra una fotografía de una superficie recubierta con pintura epoxi con un biofilm de *Pseudomona aeruginosa*, dispuesta en posición vertical, donde se aplicó mediante pulverización una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, tras un tiempo de 30 segundos (imagen izquierda) y 5 minutos (imagen derecha).

#### Figura 5:

En la figura 5 se muestra una fotografía del resultado de la aplicación del método según la presente invención (imagen izquierda), o tras la aplicación de una solución acuosa simple de peróxido de hidrógeno (imagen derecha), para la detección de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sobre superficies recubiertas con pintura epoxi, dispuestas en posición vertical, después de 5 minutos de reacción.

#### Figura 6:

En la figura 6 se muestra una fotografía del resultado de la aplicación del método según la presente invención, utilizando una composición sin colorante (imagen izquierda), o con colorante (imagen central), o tras la aplicación de una solución acuosa simple de peróxido de hidrógeno (imagen derecha), para la detección de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sobre superficies de acero inoxidable dispuestas en posición vertical, después de 5 minutos de reacción.

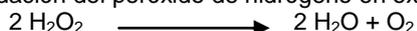
### Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es la utilización de una composición acuosa que comprende peróxido de hidrógeno y un agente espesante para detectar biofilms.

Los autores de la presente invención han desarrollado una composición basada en la combinación de peróxido de hidrógeno y un agente espesante que, sorprendentemente, es altamente efectiva para la detección de biofilm en cualquier tipo de superficies.

5 La acción detectora del biofilm de dicha composición se basa principalmente en la reacción de los biofilms con el peróxido de hidrógeno, a través de la enzima catalasa. Las catalasas son enzimas antioxidantes que están presentes en la mayoría de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y como notables excepciones en algunos anaerobios, como es el caso del género *Bacteroides*. Otras enzimas que también reaccionan con el peróxido de hidrógeno son las peroxidasas y las hidroxiperoxidasas.

Dichas enzimas catalizan la degradación del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, según la siguiente reacción:



10 Esta descomposición provoca una efervescencia debido a la liberación de oxígeno gas, que sirve de indicador de la presencia de microorganismos.

15 La mayoría de los microorganismos producen una o más catalasas que usualmente responden al estrés oxidativo, al peróxido de hidrógeno o a la presencia de otras especies reactivas de oxígeno, también denominadas ROS (del inglés *reactive oxygen species*), tal como se describe en el artículo Chelikani *et al.*, *Diversity of structures and properties among catalases*, CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 2004, 61, 192-208.

20 Generalmente, la mayoría de los biofilms en el medio ambiente son multiespecies, es decir, están formados por varias especies. Entre ellas es habitual que se encuentren bacterias aerobias, cuya catalasa sirve de indicador en la utilización de la invención.

25 La presencia de una sustancia espesante confiere a la composición una consistencia viscosa que permite prolongar el tiempo de contacto del producto con el biofilm, favoreciéndose la reacción enzimática de las catalasas, a la vez que se aumenta el poder de retención del oxígeno generado en el momento de efectuarse la descomposición enzimática. Todo ello permite detectar la presencia de los biofilms en las superficies de forma altamente efectiva, con una simple inspección visual.

Ventajosamente, dicha composición contiene además una base tensioactiva, que preferiblemente es espumante.

30 La base tensioactiva está formada por uno o varios tensioactivos y ejerce varias funciones. Por un lado tiene una función humectante sobre la matriz extracelular del biofilm, que facilita la acción de las catalasas sobre el peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el efecto espumante permite una mejor visualización de la efervescencia, ya que la espuma formada contribuye a la retención de las burbujas producidas por el oxígeno liberado durante la reacción.

35 Así mismo, en una realización preferida, la composición comprende además un colorante que facilita la visualización de la espuma formada mediante la reacción enzimática.

40 En la presente descripción así como en las reivindicaciones, las formas singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así por ejemplo, la referencia a "tensioactivo" incluye además dos o más tensioactivos.

#### Peróxido de hidrógeno

45 El peróxido de hidrógeno se halla presente en la composición de la invención, y el contenido del mismo preferiblemente está comprendido entre el 0,5% y el 50%, más preferiblemente, entre el 4% y el 15%, aún más preferiblemente entre el 4,5% y el 7%, y aún más preferiblemente es aproximadamente el 5%, en donde todos los porcentajes están expresados en peso sobre el peso total de la composición.

50 Los autores de la invención han puesto de manifiesto que la composición para la detección de biofilm puede incluir un contenido de peróxido de hidrógeno amplio, preferiblemente comprendido entre el 0,5% y el 50%, si bien el contenido de peróxido de hidrógeno puede ser incluso superior.

55 No obstante, se ha observado que con concentraciones relativamente bajas de peróxido de hidrógeno, preferiblemente comprendidas entre el 4% y el 15%, más preferiblemente entre el 4,5% y el 7%, y aún más preferiblemente con una concentración de aproximadamente el 5%, las composiciones son altamente efectivas para detectar el biofilm, sin necesidad de emplear un contenido más elevado de peróxido de hidrógeno, lo cual redundaría en una mayor seguridad y menor coste.

#### Agente espesante

60 La composición para la detección de biofilm según la utilización de la presente invención contiene un agente espesante.

65 Entre los productos espesantes aptos para ser incorporados en las composiciones según la utilización de la presente invención están, por ejemplo, los espesantes de origen natural, como la goma guar, goma xantana, goma gellan, goma garrofin, goma tragacanto, goma welan, pectina, carboximetilcelulosa, alginatos, almidón, dextrinas,

5 carragenanos, bentonita, goma de Konjac, entre otros; así como homopolímeros o copolímeros, eventualmente reticulados, de ácidos carboxílicos o anhídridos olefinicamente saturados, tales como el ácido acrílico, ácido metacrílico o anhídrido maleico, entre otros, o sus ésteres, con grupos carboxilo libres o en forma de sal; polioles poliméricos hidrofólicamente modificados, o polioles de uretano; o mezclas de los anteriores. Dichos polímeros y copolímeros están disponibles en el mercado, por ejemplo bajo las denominaciones comerciales Carbopol<sup>®</sup>, Ultrez<sup>®</sup>, Acusol<sup>®</sup>, Acrysol<sup>®</sup>, Polygel<sup>®</sup>, Synthalen<sup>®</sup> y Stablen<sup>®</sup>. Los polímeros mencionados también se pueden emplear en asociación con silicatos modificados con peptizadores de polifosfatos inorgánicos, tales como los productos comercializados bajo la denominación Laponite<sup>®</sup>.

10 En una realización preferida, el agente espesante se elige de entre el grupo formado por goma xantana, goma guar, goma gellan, goma garrofin, goma tragacanto, carragenanos, goma de Konjac, homopolímeros o copolímeros de ácidos carboxílicos o anhídridos olefinicamente insaturados, y homopolímeros o copolímeros reticulados de ácidos carboxílicos o anhídridos olefinicamente insaturados; más preferiblemente, el agente espesante se elige entre goma xantana, goma gellan, goma Konjac y homopolímeros o copolímeros reticulados de ácidos carboxílicos o anhídridos olefinicamente insaturados.

15 Un agente espesante particularmente preferido es la goma xantana. Este producto se encuentra disponible en forma comercial a través de diversos suministradores, como, por ejemplo la goma xantana comercializada por la compañía CP Kelco, bajo la denominación comercial Keltrol<sup>®</sup>.

20 Otro agente espesante particularmente preferido son los polímeros reticulados del ácido acrílico, por ejemplo, los comercializados por la empresa Lubrizol bajo la denominación comercial Carbopol<sup>®</sup>.

25 Otro agente espesante particularmente preferido es la goma gellan, que está disponible comercialmente a través de diversos suministradores, como, por ejemplo por la empresa CP Kelco, bajo la denominación comercial Kelcogel<sup>®</sup>.

Otro agente espesante particularmente preferido son los carragenanos, que están disponibles comercialmente a través de diversos suministradores, como, por ejemplo por la empresa CP Kelco, bajo la denominación comercial Kelcogel<sup>®</sup> BF.

30 Otro agente espesante particularmente preferido es la goma Konjac. Este producto también se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo a través de la compañía FMC Corp., bajo la denominación Nutricol<sup>®</sup>.

35 La incorporación de un agente espesante permite disponer de una composición con una viscosidad relativamente elevada. Así pues, preferiblemente, la composición de la invención tiene una viscosidad comprendida entre 100 y 1000 mPa.s, preferiblemente entre 300 y 600 mPa.s, y más preferiblemente aproximadamente 500 mPa.s.

40 El contenido del agente espesante está preferiblemente comprendido entre el 0,05% y el 5%, y más preferiblemente comprendido entre el 0,1% y el 2%, donde el porcentaje está expresado en peso sobre el peso total de la composición.

#### Tensioactivo

45 Preferiblemente, la composición para la detección de biofilm comprende adicionalmente un tensioactivo.

50 En dicha composición, el tensioactivo ejerce, por un lado, una función humectante sobre la matriz extracelular del biofilm, lo que favorece la acción de las catalasas sobre el peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el efecto espumante del tensioactivo facilita la visualización de la efervescencia, debido a la retención de las burbujas producidas por el oxígeno liberado durante la reacción entre el peróxido de hidrógeno y la catalasa presente en los microorganismos que forman el biofilm.

55 Los tensioactivos, como es bien conocido por el experto en la materia, son sustancias anfífilas que poseen una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica. Esta estructura química particular de los tensioactivos es responsable de sus propiedades, por ejemplo, de su acción como humectantes, al reducir la tensión superficial del líquido con lo que se favorece el mojado de las superficies. Los tensioactivos también tienen, en general, propiedades espumantes, favoreciendo la formación de espuma, a no ser que hayan sido diseñados como tensioactivos de baja espuma para aplicaciones en las que la formación de espuma no es deseable.

60 Una gran variedad de productos tensioactivos puede obtenerse de forma comercial a partir de diversos suministradores, tales como, por ejemplo, las compañías Kao Corporation, BASF, Croda, Huntsman, Clariant o Evonik, entre otras.

65 Los tensioactivos apropiados para la utilización según la presente invención son preferiblemente espumantes, y se seleccionan preferiblemente de entre el grupo formado por tensioactivos aniónicos, tensioactivos anfóteros, tensioactivos no iónicos, y mezclas de los mismos.

En una realización particularmente preferida, la composición según la utilización de la presente invención comprende una mezcla de tensioactivos aniónicos y no iónicos.

5 Entre los tensioactivos aniónicos apropiados para ser usados en el marco de la presente invención se encuentran, por ejemplo, jabones, ácidos alquilbencenosulfónicos y sus sales,  $\alpha$ -olefinas sulfonadas, parafinas sulfonadas, sulfatos de alquilo, sulfatos de éteres de alquilo, sulfatos de éteres de glicerina, sulfosuccinatos de alquilo, éteres de ácidos carboxílicos y sus sales, fosfafos de alquilo, fosfatos de éteres de alquilo, sulfatos de alquilfenoles, sulfatos de éteres de alquilfenoles, isetionatos, sarcosinatos, tauratos, y sales de N-acilaminoácidos. Por sólo citar algunos  
10 ejemplos de este grupo, entre los sulfatos de éteres de alquilo se encuentra el lauril éter sulfato sódico, como el suministrado por la compañía Kao Corporation bajo la denominación comercial Emal<sup>®</sup> o la gama de productos Texapon<sup>®</sup> de la compañía Cognis (actualmente BASF); los sulfatos de alquilo se encuentran comercializados bajo la denominación Sulfopon<sup>®</sup> de la compañía Cognis (actualmente BASF); entre los éteres de ácidos carboxílicos se encuentran los suministrados por la compañía Kao Corporation bajo la denominación comercial Akypo<sup>®</sup>; o entre los  
15 ácidos alquilbencenosulfónicos cabe citar, por ejemplo, los ácidos alquilbenceno sulfónicos lineales (LAS) especialmente el ácido n-dodecylbencenosulfónico y sus sales, como por ejemplo el suministrado por la compañía Cognis (actualmente BASF) bajo la denominación comercial Maranil<sup>®</sup>; y entre las  $\alpha$ -olefin sulfatos, como por ejemplo los suministrados por la compañía Clariant bajo la denominación de Hostapur<sup>®</sup>.

20 Preferiblemente, el tensioactivo aniónico es un sulfato de éter de alquilo.

Entre los tensioactivos no iónicos apropiados para ser usados en el marco de la presente invención se encuentran, por ejemplo, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos etoxilados, alquilfenoles etoxilados, alcanolamidas de ácidos grasos, alcanolamidas etoxiladas de ácidos grasos, aminas grasas etoxiladas, óxidos de amina grasos, óxidos de amidoaminas grasas, esterres de glicerina y ácidos grasos, esterres de sorbitán, esterres de sorbitán  
25 etoxilado, esterres de sacarosa, alquilpoliglicósidos, copolímeros de óxido de etileno/propileno, entre otros. Así, por ejemplo, entre los alcoholes grasos etoxilados pueden citarse los suministrados por la compañía Cognis (actualmente BASF) bajo la denominación comercial Dehydol<sup>®</sup>. Entre los esterres de sorbitán etoxilado pueden mencionarse los suministrados por la compañía Kao Corporation bajo la denominación comercial Rheodol<sup>®</sup>. Entre los alquilfenoles etoxilados se pueden mencionar los productos comercializados bajo la denominación Dehydrophen<sup>®</sup>  
30 por la compañía Cognis (actualmente BASF).

Preferiblemente, el tensioactivo no iónico se selecciona de entre el grupo formado por alcohol graso etoxilado, éster de sorbitán etoxilado y alquilpoliglicósido; más preferiblemente, el tensioactivo no iónico es un alcohol graso etoxilado.

35 En el libro M. Asch y I. Asch, *Handbook of Industrial Surfactants*, cuarta edición, Synapse Information Resources, 2005, puede encontrarse una extensa relación de los tensioactivos disponibles comercialmente.

40 El contenido de tensioactivo en la composición de la invención está preferiblemente comprendido entre el 3% y el 25%, más preferiblemente entre el 5% y el 15%, en donde el porcentaje está expresado en peso sobre el peso total de la composición.

45 En una realización preferida, la composición comprende una mezcla de tensioactivos aniónicos y no iónicos, en donde el contenido de tensioactivo no iónico está preferiblemente comprendido entre el 1% y el 15%, más preferiblemente entre el 3% y el 10%, y aún más preferiblemente entre el 5% y el 8%; y el contenido de tensioactivo aniónico está preferiblemente comprendido entre el 0,5% y el 10% de tensioactivos aniónicos, más preferiblemente entre el 1% y el 8%, y aún más preferiblemente entre el 2% y el 5%, en donde el porcentaje está expresado en peso sobre el peso total de la composición

## 50 Colorante

Así mismo, en una realización preferida la composición según la presente invención contiene además un colorante.

55 La presencia de un colorante en la formulación facilita la visualización de la formación de espuma debida a la reacción enzimática entre la catalasa y el peróxido de hidrógeno.

El colorante usado puede ser cualquier colorante de los habitualmente utilizados en los productos de alimentación o limpieza, según son conocidos por el experto en la materia, y que sea estable en la composición de la invención.

60 Preferiblemente el colorante utilizado es muy soluble en agua, lo que evita la coloración de las superficies evaluadas y reduce la dificultad para su eliminación, como sucede actualmente con algunos de los productos disponibles en el mercado. Adicionalmente, el colorante es capaz de colorear la espuma formada, para facilitar la visualización de la reacción enzimática.

65 Materiales colorantes adecuados para uso en la presente invención son, por ejemplo, colorantes de antraquinona, colorantes azoicos, o colorantes de triarilmetano.

Algunos de los colorantes apropiados para ser incorporados en la composición según la invención son, por ejemplo, Ponceau 4R (también denominado Rojo Ácido 18, E124, o rojo cochinilla, C.I. 16255, disponible comercialmente, por ejemplo, bajo la denominación Sanolin® Ponceau 4RC 82), Rojo Reactivo 180 (C.I. 181055C.I., disponible comercialmente, por ejemplo, bajo la denominación Duasyn® Brilliant Red F3B-SF), Azul Ácido 9 (C.I.42090, disponible comercialmente, por ejemplo, bajo la denominación Sanolin® Blue AE 90), Amarillo Ácido 23 (también denominado tartrazina, o E102, C.I.19140, disponible comercialmente, por ejemplo, bajo la denominación Sanolin® Tartrazine X90), entre otros.

Cuando está presente en la composición, el contenido de colorante está preferiblemente comprendido entre el 0,0001% y el 1,0%, más preferiblemente entre el 0,001% y el 0,5%, y aún más preferiblemente entre el 0,005% y el 0,2%, expresado en peso sobre el peso total de la composición.

#### Otros componentes

Adicionalmente, la composición para detectar biofilms según la utilización de la presente invención puede contener otros componentes, como por ejemplo, secuestrantes, antioxidantes, o sustancias modificadoras del pH, entre otras.

En una realización preferida, la composición comprende además un agente secuestrante.

Como es bien conocido por el experto en la materia, los agentes secuestrantes, también denominados quelantes, son sustancias capaces de formar complejos solubles con iones metálicos. En concreto, en el marco de la detergencia, su presencia permite mejorar la acción de los tensioactivos, al eliminar los iones metálicos del medio, principalmente calcio y magnesio, disminuyendo la dureza del agua y reduciendo la formación de sales insolubles. Además, en el campo de las composiciones que comprenden peróxido de hidrógeno, los agentes secuestrantes tienen la función de complejar iones de metales pesados que eventualmente pueden catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en la composición.

Algunos de los agentes secuestrantes adecuados para ser utilizados en el marco de la presente invención son, por ejemplo, polifosfatos, especialmente tripolifosfatos y pirofosfatos alcalinos; fosfonatos, como por ejemplo, HEDP (ácido 1-hidroxietano 1,1-difosfónico), DTPMP (ácido dietilentriamino pentametilfosfónico), EDTMP (ácido etilendiamino tetrametilfosfónico), ATMP (ácido amino trimetilfosfónico), o HDTMP (ácido hexametildiamino tetrametilfosfónico), o sus sales alcalinas; hidroxipolicarboxilatos, como ácido cítrico, tartárico o glucónico; aminopolicarboxilatos, como EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético), NTA (ácido nitrilo triacético), o GLDA (ácido glutámico, N,N-diacético) o sus sales sódicas; o sus mezclas.

Preferiblemente, el agente secuestrante se elige de entre el grupo formado por los fosfonatos HEDP, DTPMP, EDTMP, ATMP, HDTMP, o sus sales sódicas, o sus mezclas.

Cuando el agente secuestrante se encuentra en la composición según la utilización de la presente invención, el contenido del mismo está comprendido entre el 0,001% y el 5%, más preferiblemente entre el 0,01% y el 1,0%, y aún más preferiblemente entre el 0,05% y el 0,5%, en donde el porcentaje está expresado en peso sobre el peso total de la composición.

La composición de la invención puede también contener adicionalmente sustancias estabilizantes.

Entre los estabilizantes apropiados para ser utilizados en el ámbito de la presente invención están, por ejemplo, 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno (BHT), *tert*-butil hidroxianisol (BHA), ácido trimetoxibenzoico (TMBA),  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol, etoxiquina, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, ácido ascórbico, ácido sórbico y sus sales, ácido dihidroxifumárico y sus sales, ácido lignosulfónico y sus sales, ácido gálico y sus ésteres alquílicos, ácido p-anísico y sus sales, ácido benzoico y sus sales, 4-hidroxi-TEMPO, ácido p-toluensulfónico y sus sales, hidroquinonas y sus derivados (como 2,5-di-*tert*-butil hidroquinona o DTBHQ, toluhidroquinona o THQ, o mono-*tert*-butil hidroquinona o MTBHQ) entre otros, y sus mezclas.

Preferiblemente se emplea BHT como estabilizante.

La cantidad de estabilizante está preferiblemente comprendida entre el 0,001% y 1%, más preferiblemente comprendida entre el 0,01% y el 0,5%, y aún más preferiblemente entre el 0,05% y el 0,3%, en donde el porcentaje está expresado en peso sobre el peso total de la composición.

Opcionalmente, la composición para la detección de biofilm puede contener agentes reguladores del pH, por ejemplo, de carácter ácido, tales como ácidos minerales, o carboxílicos.

Adicionalmente, las composiciones según la utilización de la presente invención pueden contener otros componentes adicionales, como estabilizadores de espuma o conservantes, por ejemplo.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, la composición para la detección de biofilms comprende:

- 5       – entre el 4% y el 15% de peróxido de hidrógeno, preferiblemente entre el 4,5% y el 7%, y más preferiblemente aproximadamente el 5%;
- entre el 0,05% y el 5% de un espesante, preferiblemente entre el 0,1% y el 2%;
- entre el 3% y el 25% de tensioactivo, preferiblemente entre el 5% y el 15%;
- entre el 0,0001% y el 1% de colorante, preferiblemente entre el 0,001% y el 0,5%;
- 10      – entre el 0,001% y el 5% de un agente secuestrante, preferiblemente entre el 0,01% y el 1,0%; y
- entre el 0,001% y 1% de estabilizante, preferiblemente entre el 0,01% y el 0,5%, y más preferiblemente entre el 0,05% y el 0,3%.

Estos porcentajes están expresados en peso con respecto al peso total de la composición. La composición se completa con la cantidad suficiente de agua hasta obtener el 100%.

- 15       En una realización más preferida de la presente invención, la composición para la detección de biofilm comprende:
- entre el 4% y el 15% de peróxido de hidrógeno, preferiblemente entre el 4,5% y el 10%, más preferiblemente aproximadamente el 5%;
  - entre el 0,05% y el 5% de un espesante, preferiblemente entre 0,1% y 2%;
  - 20      – entre el 1% y el 15% de tensioactivo no iónico, preferiblemente entre el 3% y el 10%;
  - entre el 0,5% y el 10% de tensioactivo aniónico, preferiblemente entre el 1% y el 8%;
  - entre el 0,0001% y el 1% de colorante, preferiblemente entre el 0,001% y el 0,5%;
  - entre el 0,001% y el 5% de un agente secuestrante, preferiblemente entre el 0,01% y el 1,0%; y
  - entre el 0,001% y el 1% de estabilizante, preferiblemente entre el 0,01% y el 0,5%, y más preferiblemente entre el 0,05% y el 0,3%.

25       Estos porcentajes están expresados en peso con respecto al peso total de la composición. La composición se completa con la cantidad suficiente de agua hasta obtener el 100%.

30       En el contexto de la descripción, los porcentajes en peso se refieren al peso en materia activa de cada componente.

      En una realización particularmente preferida el espesante se selecciona de entre el grupo formado por goma xantana, goma gellan, goma Konjac y polímeros reticulados del ácido acrílico; el tensioactivo aniónico es un sulfato de éter de alquilo; y el tensioactivo no iónico es un alcohol graso etoxilado.

35       La preparación de la composición según la utilización de la presente invención se realiza según procedimientos que son bien conocidos en el campo de la tecnología de los detergentes y productos de limpieza. Por ejemplo, se puede preparar por disolución de los diferentes componentes en agua, bajo agitación hasta conseguir una disolución homogénea.

#### 40       Método para la detección de biofilm

      También forma parte del objeto de la presente invención un método para detectar biofilms en una superficie, que comprende las siguientes etapas:

- 45      (i) pulverizar sobre dicha superficie una composición que comprende peróxido de hidrógeno y un agente espesante;
- (ii) dejar actuar la composición durante un período comprendido entre 30 segundos y 20 minutos; e
- (iii) inspeccionar visualmente la aparición de burbujeo.

50       La acción de pulverizar requerida en la etapa (i) se refiere la acción de aplicar una fina capa de la composición sobre la superficie, esparcida en pequeñas gotas, para lo cual puede utilizarse cualquier dispositivo para pulverización estándar, por ejemplo, en forma de pistola manual para pulverización, o mediante el empleo de una bomba impulsora.

55       La composición aplicada según la etapa (i) tiene preferiblemente todas las mismas características ya descritas anteriormente.

      La aparición de burbujeo es indicativa de la reacción enzimática de las catalasas presentes en el biofilm y, por lo tanto, permite la detección de la presencia del mismo en la superficie por simple inspección visual.

60       La simplicidad de este método tiene la ventaja de permitir su aplicación para la detección de biofilm *in situ* en cualquier superficie, tanto a nivel de instalaciones industriales, como a nivel doméstico, y permite la detección rápida y eficaz de biofilms.

65       Este método permite la detección de biofilms, tanto monoespecie como multiespecie, que son catalasa-positivos. Ejemplos de microorganismos que poseen algún tipo de catalasa son, por ejemplo, dentro del género bacteriano,

*Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Helicobacter*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, entre otros; y dentro del género fúngico, *Saccharomyces*, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, entre otros, tal como se describe en el artículo Beltrán-García *et al.*, *Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas?*, Rev. Mex. Fitopatol., 2006, 24 (1), 50-58.

En la práctica, este método resulta adecuado para la detección de la práctica totalidad de biofilms habitualmente presentes en el ámbito industrial y doméstico, ya que por lo general siempre incluyen una bacteria que sea catalasa-positiva. Dado que la mayoría de los biofilms en el medio ambiente son de tipo multiespecie, es suficiente con que el biofilm incluya al menos una especie catalasa-positiva para ser sensible al método de detección.

En cuanto a la superficie, prácticamente cualquier tipo de superficie es susceptible de serle aplicado el método de detección de biofilm de la presente invención, tanto metálicas, como por ejemplo de aluminio, cromo, acero, o acero inoxidable; como superficies de vidrio, cerámica o porcelana; así como cualquier de cualquier tipo de plástico, tales como polímeros termoplásticos o termoestables, por ejemplo resinas epoxi; entre otros posibles materiales.

La superficie a analizar puede estar en cualquier disposición, tanto en posición horizontal, vertical y en techos.

En la figura 1 se muestra una fotografía de una superficie de acero inoxidable, dispuesta en posición horizontal, sobre la que se aplicó el método de la invención para la detección de un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

Análogamente, en la figura 2 se muestra una fotografía de la aplicación del método de la invención para la detección del mismo tipo de biofilm también sobre una superficie de acero inoxidable, pero esta vez dispuesta en posición vertical.

Según puede apreciarse en dichas fotografías, tras la pulverización del producto de la invención sobre la superficie, la presencia de biofilm provoca la aparición de un burbujeo, que es fácilmente observable por simple inspección visual.

El período de tiempo requerido en la etapa (ii) del método, durante el cual debe dejarse actuar la composición, oscila entre 30 segundos y 20 minutos, y será dependiente de la producción enzimática de la catalasa y, por consiguiente, de la densidad del biofilm en la superficie. Preferiblemente, el tiempo de actuación es de entre 30 segundos y 5 minutos, ya que no es necesario un tiempo superior para una detección eficaz del biofilm, si bien puede opcionalmente dejarse actuar durante un período superior, de hasta 20 minutos aproximadamente, sin menoscabo de la eficacia.

El método desarrollado en la presente invención presenta la ventaja que es válido para la detección de biofilms en cualquier superficie y en cualquier ámbito. Puede resultar especialmente útil en aquellos ámbitos en los que los requisitos de higiene son particularmente estrictos, como la industria alimentaria o en el marco sanitario.

En particular, el presente método para la detección de biofilm puede ser particularmente ventajoso como auxiliar para el establecimiento de Puntos Críticos de Control (PCC) en las superficies de la industria agroalimentaria.

Ejemplo 1: Composiciones para la detección de biofilm

Se prepararon 7 formulaciones (A a G) de composiciones para la detección de biofilm, según la utilización de la presente invención, utilizando las proporciones detalladas en la siguiente tabla:

	Composiciones (% de materia activa en peso)						
	A	B	C	D	E	F	G
Peróxido de hidrógeno	0,5	1	3	5	7	10	15
Espesante	0,10	0,15	0,20	0,25	0,75	1,00	1,50
Alcohol graso etoxilado	1	5	5	7	8	10	14
Sulfato de éter de alquilo	14	10	8	3	5	5	1
Fosfonatos	0	0,025	0,05	0,2	25	3	5
Colorante	0	0,0001	0,001	0,01	0,02	0,05	0,1

BHT	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Agua	c.s.p 100						

Todas las composiciones obtenidas presentaban una viscosidad comprendida entre 300 y 600 mPa.s.

Ejemplo 2: Ensayos de eficacia en la detección de biofilms

5

La eficacia de las composiciones de la invención se determinó frente a biofilms que se prepararon siguiendo procedimientos bien conocidos por el experto en la materia tal como los descritos en, por ejemplo, los artículos Fuster *et al.*, *Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces*, Food Control, 2008, 19 (3), 308-314 y Montañez-Izquierdo *et al.*, *Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling Listeria monocytogenes biofilms on stainless steel surfaces*, Food Control, 2012, 23 (2), 470-477. Para ello, se realizaron ensayos con diferentes condiciones de humedad, temperatura y tiempo, seleccionándose aquellas que permitían una óptima adherencia del microorganismo a las distintas superficies de prueba, y que además permitían reproducir los biofilms con una formación homogénea y repetitiva.

10

15

Se diseñaron biofilms con microorganismos de problemática general en el sector alimentario y hospitalario, como: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, y *Candida albicans*. Además, como testigo de catalasa negativa *Lactobacillus* spp.

20

A continuación, se ensayaron las 7 composiciones preparadas en el ejemplo 1 (composiciones de A a G), todas ellas dentro del marco de la presente invención. Para ello, las composiciones fueron pulverizadas sobre los biofilms en las superficies mencionadas, tanto en disposición horizontal como vertical. Después de pulverizar, se realizó una inspección visual a diferentes tiempos, observándose la producción de una efervescencia fácilmente visible, indicativa de la presencia de biofilms.

25

Las fórmulas con colorante (B a G) resultaron más eficaces en cuanto a facilitar la visualización de la efervescencia generada.

Las figuras 1 y 2 muestran dos fotografías con el resultado del ensayo realizado con la formulación B, sobre la superficie dispuesta horizontalmente y verticalmente, respectivamente. Puede observarse a simple vista la efervescencia, indicadora de la presencia de biofilm.

Ejemplo 3: Ensayos comparativos de eficacia

30

Se utilizaron superficies recubiertas con pintura epoxi para el desarrollo de biofilms de *Pseudomona aeruginosa*.

35

En la figura 3 se muestran dos superficies recubiertas con pintura epoxi en cuya superficie se han desarrollado sendos biofilms de *Pseudomona aeruginosa*. Las superficies se encuentran dispuestas en posición horizontal, y en la figura 3A se muestran después de 30 segundos de haber pulverizado la composición según la presente invención (imagen izquierda) y una solución simple compuesta de agua y peróxido de hidrógeno de la misma concentración (imagen derecha).

40

En la figura 3B se muestra una fotografía con las mismas superficies de la figura 3, pero después de 5 minutos de reacción.

45

En la figura 3C se muestra una fotografía con las mismas superficies de la figura 3, pero después de 15 minutos de reacción.

50

El burbujeo generado con la composición según la presente invención se hace más visible, ya que es más fuerte, aglutinado y permanece a lo largo del tiempo con respecto al de la solución simple donde se observa débil, disperso y desaparece a lo largo del tiempo.

55

En la figura 4 se muestra una fotografía de una superficie recubierta con pintura epoxi con un biofilm de *Pseudomona aeruginosa*, dispuesta en posición vertical, donde se aplicó mediante pulverización la solución simple compuesta de agua y peróxido de hidrógeno usada en el ensayo de la figura 3. Los tiempos de reacción son de 30 segundos y 5 minutos para la imagen izquierda y derecha, respectivamente.

60

Se aprecia un burbujeo inicial escaso a los 30 segundos (señalado por el óvalo en imagen izquierda) que difícilmente permanece visible a medida que avanza el tiempo (señalado por el óvalo en imagen derecha).

En la figura 5 se muestra una fotografía de dos superficies recubiertas con pintura epoxi con biofilms de *Pseudomona aeruginosa*, dispuestas en posición vertical, después de 5 minutos de reacción al pulverizar la composición según la presente invención (imagen izquierda) y una solución simple compuesta de agua y peróxido de hidrógeno de la misma concentración (imagen derecha).

En la superficie recubierta con pintura epoxi dispuesta en posición vertical, se aprecia una gran diferencia en la producción del burbujeo y su permanencia a lo largo del tiempo con la composición según la presente invención con

respecto a la solución simple, donde la producción del burbujeo se percibe débil, ya que se desliza y rápidamente desaparece.

5 En la figura 6 se muestra una fotografía de tres superficies de acero inoxidable con biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, dispuestas en posición vertical, después de 5 minutos de reacción al pulverizar la solución simple compuesta de agua y peróxido de hidrógeno (superficie derecha), una composición según la presente invención (superficie centro) y una composición según la presente invención sin colorante (superficie izquierda).

10 Aquí se puede apreciar, como a una distancia razonable, menor de un metro, se visualiza mejor el biofilm del centro por la producción de burbujeo y el color, aun cuando la coloración no es intensa, ésta ayuda a su fácil detección con respecto al biofilm derecho donde lleva espesante, pero no colorante.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Utilización de una composición acuosa que comprende peróxido de hidrógeno y un agente espesante para detectar biofilms.
- 2.- Utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque el contenido de peróxido de hidrógeno está comprendido entre el 0,5% y el 50%, expresado en peso sobre el peso total de la composición.
- 10 3.- Utilización según la reivindicación 2, caracterizado porque el contenido de peróxido de hidrógeno está comprendido entre el 4,5% y el 7%, expresado en peso sobre el peso total de la composición.
- 15 4.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el agente espesante se elige de entre el grupo formado por goma xantana, goma guar, goma gellan, goma garrofín, goma tragacanto, carragenanos, goma de Konjac, homopolímeros o copolímeros de ácidos carboxílicos, o anhídridos olefinicamente insaturados, y homopolímeros o copolímeros reticulados de ácidos carboxílicos o anhídridos olefinicamente insaturados.
- 20 5.- Utilización según la reivindicación 4, caracterizado porque el agente espesante se elige entre goma xantana, goma gellan, goma Konjac y homopolímeros o copolímeros reticulados de ácidos carboxílicos o anhídridos olefinicamente insaturados.
- 6.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el contenido de agente espesante está comprendido entre el 0,05% y el 5%, expresado en peso sobre el peso total de la composición.
- 25 7.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la composición contiene adicionalmente un tensioactivo.
- 8- Utilización según la reivindicación 7, caracterizado porque el tensioactivo se selecciona de entre el grupo formado por tensioactivos aniónicos, tensioactivos anfóteros, tensioactivos no iónicos, y mezclas de los mismos.
- 30 9.- Utilización según la reivindicación 8, caracterizado porque la composición comprende una mezcla de tensioactivos aniónicos y no iónicos.
- 35 10.- Utilización según la reivindicación 9, caracterizado porque el tensioactivo aniónico es un sulfato de éter de alquilo y el tensioactivo no iónico se selecciona de entre el grupo formado por alcohol graso etoxilado, éster de sorbitan etoxilado y alquilpoliglicósido.
- 11.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado porque el contenido de tensioactivo está comprendido entre el 3% y el 25%, expresado en peso sobre el peso total de la composición.
- 40 12.- Utilización según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque el contenido de tensioactivo no iónico está comprendido entre el 1% y el 15%, y el contenido de tensioactivo aniónico está comprendido entre el 0,5% y el 10%, expresado en peso sobre el peso total de la composición.
- 45 13.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la composición contiene además un colorante.
- 14.- Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 caracterizado porque la composición contiene además un agente secuestrante.
- 50 15.- Utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque la composición comprende:
- entre el 4% y el 15% de peróxido de hidrógeno;
  - entre el 0,05% y el 5% de un espesante;
  - entre el 3% y el 25% de tensioactivo;
  - entre el 0,0001% y el 1% de colorante;
- 55 - entre el 0,001% y el 5% de un agente secuestrante; y
- entre el 0,001% y 1% de estabilizante,
- en donde los porcentajes están expresados en peso con respecto al peso total de la composición.
- 60 16.- Utilización según la reivindicación 1, caracterizado porque la composición comprende:
- entre el 4% y el 15% de peróxido de hidrógeno;
  - entre el 0,05% y 5% de un espesante;
  - entre el 1% y el 15% de tensioactivo no iónico;
  - entre el 0,5% y el 10% de tensioactivo aniónico;
  - entre el 0,0001% y el 1% de colorante;
- 65 - entre el 0,001% y el 5% de un agente secuestrante; y

– entre el 0,001% y el 1% de estabilizante,  
en donde los porcentajes están expresados en peso con respecto al peso total de la composición

- 5 17.- Método para detección de biofilm en una superficie, que comprende las siguientes etapas:
- (i) pulverizar sobre dicha superficie una composición acuosa que comprende peróxido de hidrógeno y un agente espesante;
  - (ii) dejar actuar la composición durante un período comprendido entre 30 segundos y 20 minutos; e
  - (iii) inspeccionar visualmente la aparición de burbujeo.
- 10 18.- Método según la reivindicación 17, caracterizado porque la composición pulverizada en la etapa (i) es según se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16.

FIGURA 1



FIGURA 2

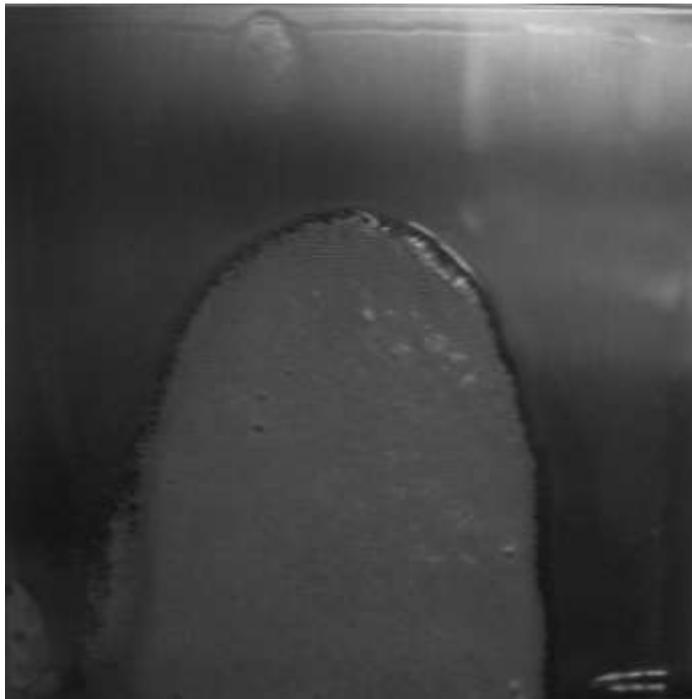
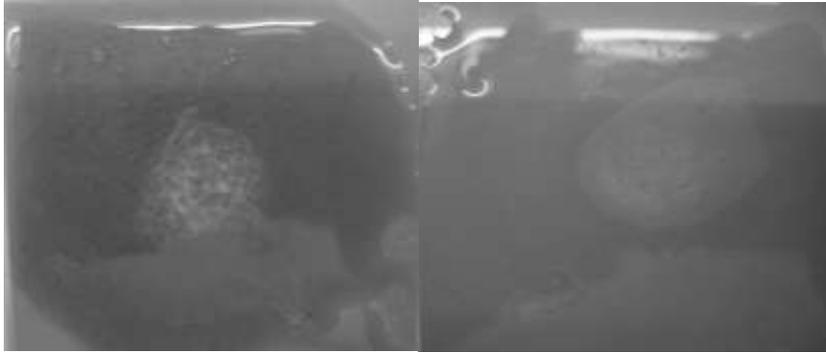
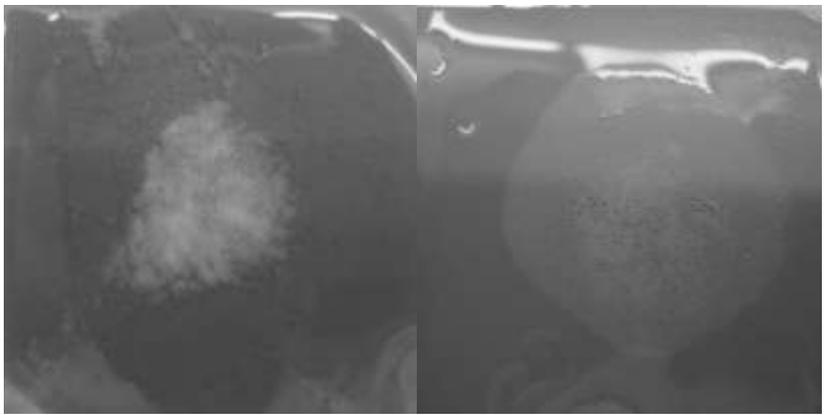


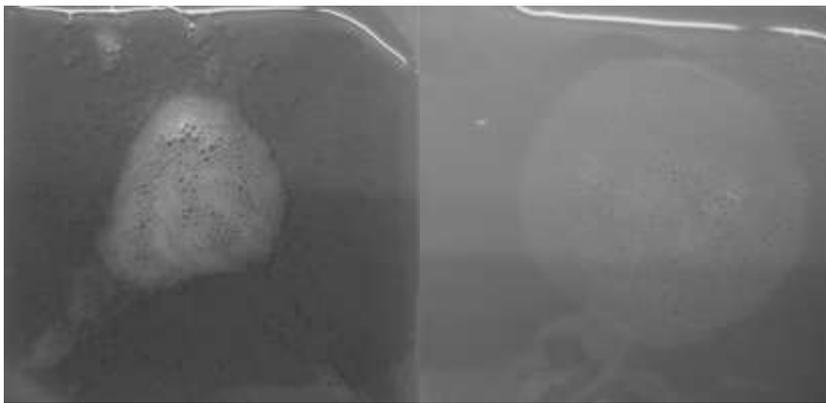
FIGURA 3



A



B



C

FIGURA 4

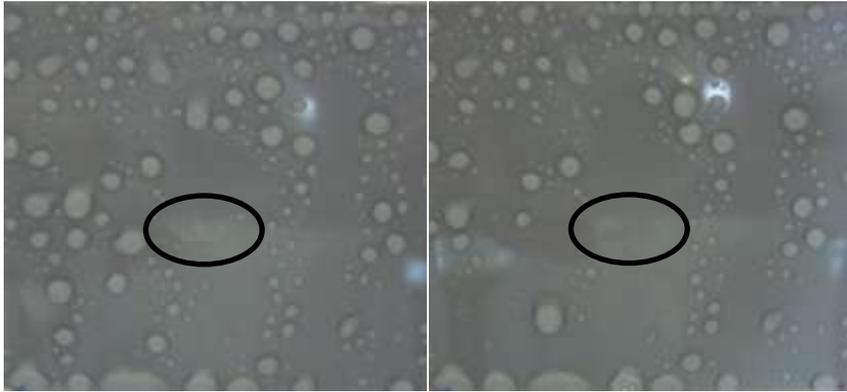
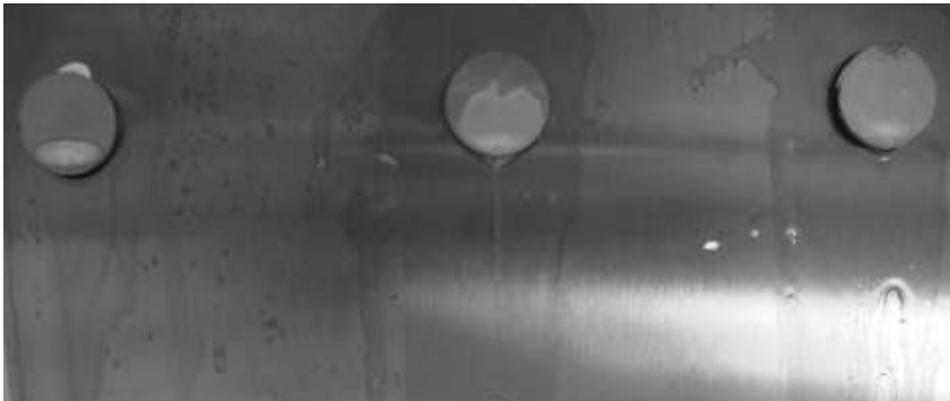


FIGURA 5



FIGURA 6





- ②① N.º solicitud: 201231482  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2012  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/04** (2006.01)  
**C12Q1/30** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JP S61162199 A (CALPIS FOOD IND CO LTD) 22.07.1986, Resumen de la base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE [en línea] [recuperado el 30.10.2013]	1-12,17,18
Y		13-16
Y	US 2009208996 A1 (KADURUGAMUWA JAGATH et al.) 20.08.2009, reivindicaciones 1,12,13-16; ejemplos; párrafos 43-51,61.	13-16
X	FR 2611744 A1 (BIOMERIEUX SA) 09.09.1988, reivindicaciones; página 4, línea 26 – página 6, línea 2; ejemplos.	1-6,13,17,18
A	EP 0105747 A1 (VENTURECARE LTD) 18.04.1984, reivindicaciones.	1,13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 04.12.2013	Examinador A. I. Polo Diez	Página 1/5
------------------------------------------------	-------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET, DB-TXTE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.12.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 4, 5, 10-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-3, 6-9, 17, 18	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JP S61162199 A (CALPIS FOOD IND CO LTD)	22.07.1986
D02	US 2009208996 A1 (KADURUGAMUWA JAGATH et al.)	20.08.2009
D03	FR 2611744 A1 (BIOMERIEUX SA)	09.09.1988

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere, según la primera reivindicación, a la utilización de una composición acuosa que comprende peróxido de hidrógeno y un agente espesante para detectar biofilms.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 16 dan detalles de las cantidades, de los tipos de agente espesante y de otros compuestos adecuados para la composición.

También es objeto de la invención el método para detección de un biofilm en superficie que comprende pulverizar la composición de la reivindicación 1, dejar actuar un tiempo e inspeccionar el burbujeo producido (reivindicaciones 17 y 18)

**Novedad (art. 6.2 de L.P)**

El documento D01, resumen de una patente japonesa, divulga una composición para detectar microorganismos sobre superficies (biofilms) que contiene agua oxigenada (entre un 0,2 a un 5%). La detección se basa en que los microorganismos presentan actividad catalasa que produce oxígeno (burbujas) en presencia de agua oxigenada. Para aumentar la eficacia de la composición se añade una mezcla que mejora la visibilidad de las burbujas que consiste en un espumante (surfactante o tensioactivo) y un estabilizador de la espuma (como por ejemplo una goma soluble en agua). La composición se extiende sobre la superficie en la que se quieren detectar los microorganismos y las burbujas se observan a simple vista.

Este documento divulga la misma composición y método que la solicitud, por lo que afecta a la novedad de las reivindicaciones 1-3, 6-9, 17, 18.

El documento D02 se refiere a una composición viscosa que contiene agua oxigenada (en un 2,5 a un 6%) y un espesante.

Tanto el espesante como el colorante, que también se puede añadir a la composición favorecen la observación de las burbujas (página 4, línea 28-página 6, línea 2; ejemplos).

Las reivindicaciones 1-3, 6, 13 no tienen novedad a la vista de este documento que divulga la misma composición que la solicitud.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-3, 6-9, 17 y 18 carecen de novedad.

**Actividad inventiva (art. 8.2 de L.P.)**

Las reivindicaciones dependientes 4, 5, 10-16 son novedosas pero se refieren a características, que, en combinación con las características de las que dependen, no les otorgan actividad inventiva.

Las reivindicaciones 4, 5 y 10 son una enumeración de los posibles espesantes y tensioactivos a utilizar en la composición. Se trata de compuestos habitualmente utilizados en el estado de la técnica con la misma finalidad, por lo que un experto en la materia elegiría unos u otros en función de sus necesidades para elaborar la composición descrita en el documento D01, sin ejercer actividad inventiva.

Las reivindicaciones 11 y 12 se refieren a las proporciones de los tensioactivos y las reivindicaciones 13 a 14 a otros productos añadidos a la composición como colorantes y secuestrantes. Por último, las reivindicaciones 15 y 16 concretan una composición con todos los productos mencionados en unos porcentajes concretos.

Se considera que las características de dichas reivindicaciones serían evidentes para un experto en la materia pues se trata de productos (colorantes, secuestrantes) y cantidades ya utilizados previamente en formulaciones de detectores de microorganismos como se puede ver en las diferentes composiciones descritas en el documento D03. Este documento está dirigido a un método y un kit para detectar microorganismos sobre una superficie, que se basa también en la reacción de la catalasa con el agua oxigenada. La composición contiene además del agua oxigenada un surfactante de cualquier tipo, un secuestrante, un colorante y puede tener también estabilizadores. En los ejemplos se puede ver como los productos y las proporciones divulgadas son muy parecidas a las de las reivindicaciones 11, 12, 13-16 (reivindicaciones 1, 12, 13-16; ejemplos; párrafos 43-51, 61).

Un experto en la materia conocedor de ambos documentos (D01 y D03) llegaría a composiciones como las de las reivindicaciones 11 a 16 añadiendo simplemente a alguna de las composiciones de D03 un espesante como el que aconseja utilizar el documento D01 con el fin de hacer más visibles las burbujas que evidencia la presencia de microorganismos.

Por tanto, las reivindicaciones 4, 5, 10 a 16 no cumplen el requisito de actividad inventiva.