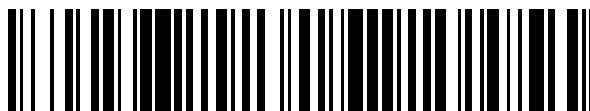


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 288**

51 Int. Cl.:

A01N 65/36 (2009.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

A23L 3/3472 (2006.01)

A23B 7/154 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2009** **E 09754110 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2296479**

54 Título: **Vapor de una mezcla de aceites esenciales cítricos y sus propiedades antimicrobianas**

30 Prioridad:

30.05.2008 GB 0809935

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

21.07.2014

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF NORTHAMPTON (100.0%)
Boughton Green Road
Northampton NN2 7AL, GB

72 Inventor/es:

PHILLIPS, CAROL y
LAIRD, KATIE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 478 288 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

Vapor de una mezcla de aceites esenciales cítricos y sus propiedades antimicrobianas

- 5 La presente invención se refiere al vapor de una mezcla de aceites esenciales y las propiedades antimicrobianas del vapor. Los vapores tienen aplicación dentro del sector de las frutas frescas/orgánicas, hortalizas y ensaladas de la industria alimenticia, la industria horticultora y el área clínica.

Antecedentes de la invención

- 10 Entre 1992 y 2006, se informó de 2274 brotes de origen alimentario, de envenenamiento de alimentos en Inglaterra y Gales, el 4 % de los cuales estaba asociado con el consumo de ensaladas preparadas. Las ensaladas frescas, hortalizas, o frutas pueden llegar a contaminarse de fuentes ambientales, y solamente en los últimos años se ha asociado la asociación de alimentos de orígenes diferentes al animal con enfermedades transmitidas por alimentos, lo que demuestra que pueden surgir problemas de salud del consumo de ensaladas, frutas y hortalizas contaminados (como se informó en Little, C. L. y Gillespie, I. A. (2008) Prepared salads and public health. Journal of Applied Microbiology, In Press). Esto es preocupante porque el sector orgánico del mercado alimentario tiene un valor de 223 millones de libras y es uno de los sectores de crecimiento más rápido con un aumento del 30 % por año desde la década de 1990 hasta 2000. Aunque ahora se ha empezado a ralentizar al 15 %, se cree que está originado por las presiones de precios descendentes procedentes de las cadenas de supermercados. Sin embargo si tiene que cumplirse el Plan de la Organic Action Plan Target con un 70 % de los productos orgánicos nativos suministrados desde RU en 2010, se requiere progreso dentro del sector, incluyendo un antimicrobiano natural que pueda de algún modo reducir la contaminación y pudrición post recolección de ensaladas, frutas y hortalizas (véase DEFRA (2006) The UK organic vegetable market (temporada 2004-2005)).

- 25 Las cantidades de bacterias resistentes a antibióticos están en aumento y tiene que hallarse una alternativa a los antibióticos. Hubo 1.087 casos informados de infecciones en el torrente sanguíneo de MRSA en Inglaterra durante el trimestre de octubre a diciembre de 2007, demostrando un aumento del 0,6 % en el trimestre previo (Health Protection Agency (2008) Latest figures show MRSA bloodstream infections plateau. Disponible en www.hpa.org.uk). En 2005 en RU hubo 7066 casos informados de bacteriemia por *Enterococcus* spp.; el 28 % de todos los casos eran resistentes a antibióticos (Health Protection Agency (2007) Bacteraemia. Disponible en www.hpa.org.uk/cdr/pages/bacteraemia.htm#entero). El riesgo de muerte por *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) es del 75 % en comparación con el 45 % para individuos infectados con una cepa susceptible a vancomicina (Bearman, G. M. L. y Wenzel, R. P. (2005) Bacteraemias: A leading cause of death. Archives of Medical Research, 36, (6) 646-659). Esto se refleja en los EE.UU: en un periodo de quince años hubo un aumento de 20 veces de VRE asociada con infecciones nosocomiales informadas al National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) del CDC (National Nosocomial Infection Surveillance (2004) informe System, resumen de datos de enero de 1992 a junio de 2004, presentado en octubre de 2004. Un informe del Sistema NNIS. American Journal of Infection Control, (32) 470-485).

- 40 Los aceites esenciales (EO) *per se* y sus propiedades antimicrobianas se han examinado ampliamente y se sabe que compuestos de plantas naturales tales como especias, hierbas y aceites esenciales inhiben el crecimiento de bacterias que envenenan los alimentos (Tassou, C. C. y Nychas, G. J. E. (1995) Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in Model Food System. International Biodeterioration & Biodegradation, 36, (3-4) 411-420, Smith-Palmer, Stewart y Fyfe (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology, 26, (2) 118-122, Tassou, C., Koutsoumanis, K. y Nychas, G. J. E. (2000) Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Research International, 33, (3-4) 273-280, Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47, 565-573, Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94, (3) 223-253 and Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E. y Gardini, F. (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. Trends in Food Science & Technology, 15, (3-4) 201-208). Las propiedades antimicrobianas de los vapores de EO, sin embargo, están relativamente inexploradas.

- Los aceites esenciales/vapores cítricos y sus componentes están reconocidos como "Generalmente Reconocidos Como Seguros" (GRAS) por la FDA, lo que sugiere que pueden tener uso dentro del área tanto clínica como alimentaria. Los estudios preliminares han demostrado que la bergamota, el limón y la naranja en solitario en forma de vapor tienen propiedades antimicrobianas contra una gama de bacterias Gram negativas y Gram positivas incluyendo *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (K. Fisher et al (2007), The Survival of three strains of *Aerobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food, Letters in Applied Microbiology, 44, (5), 495-499 and K. Fisher, C.A. Phillips (2006) The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems Journal of Applied Microbiology 101 (6), 1232-1240).

Una revisión de los usos antimicrobianos potenciales de los aceites esenciales en alimentos puede hallarse en Trends in Food Science & Technology Volumen 19, Tema 3, marzo de 2008, Páginas 156-164 (Katie Fisher and Carol Phillips, Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?).

Sumario de la invención

Se ha descubierto un vapor de una mezcla de aceites esenciales cítricos que es antimicrobiana contra una gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo cepas resistentes a antibióticos, y que también es activo contra esporas bacterianas. El vapor puede usarse en alimentos y no aparecen cambios sensoriales. El vapor también puede usarse para controlar alimentos contaminados con microorganismos.

El vapor actúa sobre superficies incluyendo aquellas de productos alimenticios frescos para reducir la contaminación por patógenos.

Debe entenderse que el término "antimicrobiano" como se usa en esta memoria descriptiva, significa "capaz de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos". El microorganismo puede ser una bacteria, virus, rickettsia, levadura u hongo.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un vapor de una mezcla que consiste en el aceite de naranja y el aceite de bergamota. Por "aceite de naranja", se entiende *Citrus sinensis*. Por "aceite de bergamota", se entiende *Citrus bergamia*.

Adecuadamente, el aceite de naranja y el aceite de bergamota están presentes en la mezcla en una proporción de 1:1 en volumen:volumen.

En una realización, el vapor de la mezcla que consiste en el aceite de naranja y el aceite de bergamota comprende los siguientes componentes: metanol, etanol, acetona, isopropanol, amina de ácido fluoroacético, fluoruro de trimetilsililo, dimetilsilanodiol, 3-heptanona, butilacetato, n-octanal, p-cimeno, limoneno, alfa-pineno, alfa-felandreno, canfeno, tuyenol, beta pineno, mirceno, careno, nonanal, nonanol, citral, linalool, 1-fluorododecano, bergamol y isobutirato de linalilo. Normalmente, el análisis de GCMS del vapor es el siguiente:

Componentes	m/z**	Recuentos/min
Metanol	33	1279
Etanol	47	391
Acetona	59	71682
Isopropanol	60	2236
Amina de ácido fluoroacético	77	4505
Fluoruro de trimetilsililo	92	58*
Dimetilsilanodiol	92	58*
3-heptanona	114	43
Butilacetato	116	110
n-octanal	128	57
p-cimeno	134	342
Limoneno	136	54440*
Alfa-pineno	136	54440*
Alfa-felandreno	136	54440*
Canfeno	136	54440*
Tuyenol	136	54440*
Beta pineno	136	54440*
Mirceno	136	54440*
Careno	136	54440*
Nonanal	142	36
Nonanol	144	36
Citral	154	186*
Linalool	154	186*
1-Fluorododecano	188	27*
Bergamol	196	26
Isobutirato de linalilo	224	25

* Pico combinado para todos los componentes del mismo peso molecular.

** m/z = proporción de masa a carga

Se ha descubierto sorprendentemente que el vapor de la mezcla de aceites tiene propiedades antimicrobianas sinérgicas en comparación con las propiedades antimicrobianas de los aceites en solitario. Además, cuando el vapor

de la mezcla se expone a productos alimenticios, no afecta al sabor u olor del alimento. Por tanto, el vapor puede ser útil como conservante alimenticio ya que tiene un efecto antimicrobiano sin contaminar el alimento. Además, el vapor es eficaz a temperaturas relativamente elevadas, por ejemplo temperaturas que varían de 25 °C a 50 °C. Por tanto, el vapor también puede ser útil como antimicrobiano en invernaderos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar un vapor de una mezcla que consiste en el aceite de naranja y el aceite de bergamota, comprendiendo el proceso calentar la mezcla a una temperatura de 30 a 50 °C durante un periodo de tiempo que varía de 10 minutos a 20 minutos. Preferiblemente, la mezcla se calienta durante 15 minutos. El vapor descrito anteriormente puede prepararse de acuerdo con este proceso.

La mezcla líquida (es decir, antes de la vaporización) tiene los siguientes componentes principales de acuerdo con GCMS:

Nombre del compuesto	Número de pico	Tiempo de pico	Proporción de compuesto como % de linalool
Isobutirato de metilo	1	5,96	0,39
2-Pentanona	2	6,06	0,88
3-Pentanona	3	6,25	1,05
1R-alfa-Pineno o alfa-Pineno	4	13,34	14,72
Beta terpineno o beta-Felandreno	5	14,48	6,78
alfa-Fencheno o Canfeno o beta-Pineno	6	14,64	48,03
beta-Mirceno	7	14,81	14,58
Octanal	8	15,24	1,25
3-Careno	9	15,57	0,84
D-Limoneno	10	16,11	822,01
Gamma terpineno	11	16,87	12,13
Linalool	12	17,88	100,00
1,2-Dihidrolinalool	13	18,80	2,26
alfa Terpineol	14	20,60	4,86
Decanal	15	20,76	1,37
Antranilato de linalilo	16	21,95	274,99
trans-Citral	17	22,54	2,52
Acetato de nerol	18	24,45	10,60
Zingibereno	19	26,42	2,51
alfa-Farneseno	20	27,68	3,17
beta-Bisaboleno	21	27,89	5,84

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un vapor descrito anteriormente como antimicrobiano, donde el vapor es antimicrobiano contra bacterias. En una realización, las bacterias son bacterias resistentes a antibióticos. En otra realización, las bacterias son bacterias Gram positivas o Gram negativas.

En una realización, las bacterias se seleccionan entre *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Arcobacter butzleri*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* y MRSA. Las bacterias *Enterococcus faecium* pueden ser *Enterococcus faecium* NCTC 07171 y/o *Enterococcus faecium* NCTC 12202. Las bacterias *Enterococcus faecalis* son *Enterococcus faecalis* NCTC 12697 y/o *Enterococcus faecalis* NCTC 12203. *Enterococcus faecium* NCTC 12202 y *Enterococcus faecalis* NCTC 12203 son ejemplos de bacterias resistentes a antibióticos.

En una realización adicional, las bacterias son bacterias que albergan esporas. El vapor puede ser capaz de destruir o inhibir el crecimiento de las esporas, así como ser antimicrobiano contra las bacterias que albergan esporas. En una realización, las esporas son aquellas de *Clostridium difficile* y/o *Bacillus cereus*.

En una realización, las bacterias están presentes en un producto alimenticio. Adecuadamente, el vapor se usa durante el procesamiento, envasado y/o almacenamiento del producto alimenticio. En una realización, el producto alimenticio es ensalada, hortalizas y/o frutas. El producto alimenticio puede someterse al vapor durante un periodo de tiempo suficiente para obtener un efecto antimicrobiano sobre el producto alimenticio, por ejemplo un periodo de tiempo que varía de 30 segundos a 1 hora, más particularmente de 30 segundos a 30 minutos, incluso más particularmente durante un periodo de tiempo que varía de 30 segundos a 5 minutos. Normalmente, el producto alimenticio se somete al vapor durante un periodo de tiempo que varía de 30 segundos a 1 minuto. Preferiblemente,

el producto alimenticio se somete al vapor durante un periodo de tiempo de 45 segundos.

También se describe que el vapor es antimicrobiano contra hongos. Los hongos pueden seleccionarse entre *Aspergillus niger* (por ejemplo, ATCC 9642), *Penicillium chrysogenum* (por ejemplo, ATCC 10106) y *Alternaria alternate* (por ejemplo, CABI 127255).

En una realización, los vapores se usan para la desinfección del aire y/o equipos en un entorno de industria alimentaria.

En otra realización, los vapores se usan para la desinfección del aire y/o los equipos en un entorno clínico.

En una realización, el vapor se usa para la desinfección de una superficie. La superficie puede exponerse al vapor durante un periodo de tiempo que varía de 1 hora a 48 horas, preferiblemente de 2 horas a 36 horas, más preferiblemente de 5 horas a 24 horas, y mucho más preferiblemente durante 24 horas.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un vapor descrito anteriormente como antimicrobiano contra patógenos vegetales. El vapor se usa en un invernadero para proteger el producto en crecimiento de patógenos vegetales. Los patógenos vegetales pueden ser, por ejemplo, bacterias, hongos o un moho.

Descripción de la invención

La mezcla de la presente invención consta de los aceites de bergamota (*Citrus bergamia*) y naranja (*Citrus sinensis*). Los aceites de bergamota y naranja son los únicos componentes de la mezcla. En una realización, los aceites están presentes en una proporción de 1:1 v/v. El vapor de la mezcla puede prepararse calentando 15 mg/l (15 mg de aceite por cada litro de aire) de la mezcla durante aproximadamente 15 minutos. Se realizó el análisis del espacio libre de GC-MS de los componentes principales en el aire después de una acumulación de 15 minutos de los vapores de la mezcla usando la siguiente técnica.

Se usó una jeringa de 50 ml para extraer aire del espacio libre y se disolvió en 10 ml de agua; se inyectó 1 µl (inyección dividida 50:1) en un GC-MS de Perkin-Elmer Turbomass con una temperatura de inyector de 250 °C. La columna capilar usada fue Zebron ZB-5 con una longitud de columna de 30 m y diámetro de 0,25 mm i.d., el gas vehículo usado fue helio a un caudal de 1 ml por min⁻¹. La temperatura inicial fue 40 °C durante 3 minutos, con una temperatura gradual de 8 °C min⁻¹ y una temperatura final de 240 °C durante 2 minutos, esto se realizó durante un total de 30 minutos. Para la detección GC/MS, se usó un sistema de ionización por impacto electrónico (EI), con energía de ionización de 70 eV con un intervalo M/z de 50 a 450 Da, con un intervalo de exploración de 0,55 segundos, retardo entre exploraciones de 0,15 segundos y un retardo de disolvente de 3 minutos. Se usaron bibliotecas NIST05 y AMDIS32 para la identificación.

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1:

Componentes	m/z**	Recuentos/min
Metanol	33	1279
Etanol	47	391
Acetona	59	71682
Isopropanol	60	2236
Amina de ácido fluoroacético	77	4505
Fluoruro de trimetilsililo	92	58*
Dimetilsilanodiol	92	58*
3-heptanona	114	43
Butilacetato	116	110
n-octanal	128	57
p-cimeno	134	342
Limoneno	136	54440*
Alfa-pineno	136	54440*
Alfa-felandreno	136	54440*
Canfeno	136	54440*
Tuyeno	136	54440*
Beta pineno	136	54440*
Mirceno	136	54440*
Careno	136	54440*
Nonanal	142	36
Nonanol	144	36
Citral	154	186*
Linalool	154	186*

1-Fluorododecano	188	27*
Bergamol	196	26
Isobutirato de linalilo	224	25

* Pico combinado para todos los componentes del mismo peso molecular.

** m/z es la proporción de masa a carga

El análisis GC-MS también se realizó sobre la mezcla de aceites esenciales en forma líquida, y los resultados se muestran en la Tabla 2.

- 5 Tabla 2 - Tabla resumen de los picos identificados y la semi-cuantificación basada en 3 análisis replicados (relativos a linalool)

Nombre del compuesto	Número de pico	Tiempo de pico	Proporción de compuesto como % de linalool	Concentración calculada mg por ml del aceite esencial*	Concentración estimada mg/ml en aceite e. basada en el área de pico de linalool**
Isobutirato de metilo	1	5,96	0,39	m	0,32
2-Pentanona	2	6,06	0,88	-	0,73
3-Pentanona	3	6,25	1,05	-	0,86
1R-alfa-Pineno o alfa-Pineno	4	13,34	14,72	-	1,2,13
Beta terpineno o beta-Felandreno	5	14,48	6,78	-	5,59
alfa-Fencheno o Canfeno o beta-Pineno	6	14,64	48,03	-	39,58
beta-Mirceno	7	14,81	14,58	-	12,02
Octanal	8	15,24	1,25	-	1,03
3-Careno	9	15,57	0,84	-	0,70
D-Limoneno	10	16,11	822,01	523,09	677,50
Gamma terpineno	11	16,87	12,13	-	10,00
Linalool	12	17,88	100,00	82,42	82,42
1,2-Dihidrolinalool	13	18,80	2,26	-	1,86
alfa Terpineol	14	20,60	4,86	-	4,01
Decanal	15	20,76	1,37	-	1,13
Antranilato de linalilo	16	21,95	274,99	-	226,64
trans-Citral	17	22,54	2,52	3,67	2,07
Acetato de nerol	18	24,45	10,60	-	8,74
Zingibereno	19	26,42	2,51	-	2,07
alfa-Farneseno	20	27,68	3,17	-	2,62
beta-Bisaboleno	21	27,89	5,84	-	4,81

notas:

* = concentración real solamente disponible para compuestos con patrón relevante

- 10 ** = concentración estimada basada en el patrón de linalool, por lo tanto conocido como 'equivalencia de linalool'. Cada compuesto, a la misma concentración, tendrá diferente factor de respuesta en el espectrómetro de masas, por tanto una concentración estimada.

- 15 En uso como antimicrobiano, el producto alimenticio a someter al vapor puede exponerse a la acumulación de vapores durante, por ejemplo, 45 segundos. Este tratamiento provoca una disminución significativa en los patógenos contaminantes.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos que deben considerarse como no limitantes.

20 Ejemplo 1

La exploración de los vapores de la mezcla de bergamota (*Citrus bergamia*) y naranja (*Citrus sinensis*) en una proporción de 1:1 v/v se realizó usando un método de difusión de disco para medir su capacidad de inhibir el crecimiento de cultivos durante una noche (10⁵). Se midieron las zonas de inhibición (diámetro en cm).

- 25 La mezcla mostró inhibición contra *Enterococcus faecium*: 2,15 cm, *Enterococcus faecalis*: 2,18 cm, *Arcobacter butzleri*: 4,07 cm, *Campylobacter jejuni*: 1,48 cm, *Escherichia coli*: 0,5 cm, *Listeria monocytogenes*: 2,05 cm, *Clostridium difficile*: 2,34 cm y esporas: 3,53, *Staphylococcus aureus*: 1,25 cm y esporas de *Bacillus cereus*: 3,97 cm.

- 30 Todos los siguientes experimentos se realizaron en *E. faecium* y *E. faecalis* porque están establecidos como especies indicadoras de contaminación fecal y sus cepas resistentes a vancomicina (VRE) son infecciones

importantes adquiridas en hospitales. Los organismos de ensayo incluyeron: *Enterococcus faecales* NCTC 12697, *Enterococcus faecium* NCTC 07171, cepas resistentes a vancomicina *Enterococcus faecales* NCTC 12203, *Enterococcus faecium* NCTC 12202.

5 Ejemplo 2

Se estableció la dosis inhibidora mínima (MID) para el vapor de una mezcla de bergamota (*Citrus bergamia*) y naranja (*Citrus sinensis*) en una proporción de 1:1 v/v usando un método de cámara de vapor (Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47, 565-573). Se aplicaron puntualmente alicuotas (0,1 ml) de cada antimicrobiano en discos de papel de filtro de 3 cm de diámetro (evaporación rápida) en diluciones de factor dos de 1600, 800, 400, 200, 100 y 50 mg/l. Los discos y las placas inoculadas (0,1 ml sembraba en extensión en placa aproximadamente 10^8 células) se colocaron en un vaso de precipitados estanco de 1,3 l, se incubaron a 25 °C, 37 °C, y 50 °C durante 24 horas. La MID fue la concentración más baja que inhibía el crecimiento bacteriano. Un control fue una cámara de vapor sin disco de papel añadido.

Globalmente, el vapor de mezcla de EO tuvo una inhibición mayor a 50 °C que a 25 °C o 37 °C, siendo la mezcla eficaz contra *E. faecium* con una MID de 400 mg/l y 100 mg/l contra *E. faecalis*, lo que ilustra uno de sus usos en invernaderos de horticultura, debido a las temperaturas requeridas para hacer la mezcla más eficaz.

20 Ejemplo 3

Se estableció la MID por el mismo método que en el ejemplo 2 contra *E. faecium* y *E. faecalis* resistente a vancomicina.

La MID necesaria para inhibir el crecimiento de la cepa resistente a vancomicina de *E. faecalis* fue la misma que para la cepa susceptible pero la dosis necesaria para la inhibición de la cepa resistente a vancomicina de *E. faecium* se redujo desde 400 mg/l hasta 200 mg/l, lo que demuestra que el vapor es igual sino mejor en la inhibición del crecimiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

30 Ejemplo 4

Se evaluó la reducción del crecimiento *in vitro* contra cepas (resistentes y susceptibles) cultivadas en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI) con un inóculo inicial de 10^6 células con la MID de la mezcla a 25 °C o 37 °C o 50 °C. Se tomaron muestras a diversos intervalos de tiempo, se sembraron en agar BHI y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los controles se cultivaron sin la presencia de los vapores.

No hubo crecimiento detectable en los experimentos de vapor a 50 °C y pH 7,5 o pH 9,5 después de 48 horas, contra las cepas susceptibles a antibióticos que demuestra de este modo una reducción 10 log en el crecimiento, la reducción en el crecimiento se volvió significativa entre 2 y 4 horas ($p = 0,001$). Los vapores solamente inhibían el crecimiento de las cepas resistentes en 4,5 log.

Este ejemplo de nuevo ilustra uno de los usos de los vapores de mezcla en entornos con temperaturas elevadas tales como invernaderos y la capacidad de los vapores de inhibir las cepas resistentes a antibióticos.

45 Ejemplo 5

Se evaluó el uso de difusores a bajas temperaturas en un espacio más grande: una unidad sellada de 600 l. Se difundieron concentraciones de 5, 10, 15 y 30 mg/l de la mezcla de bergamota (*Citrus bergamia*) y naranja (*Citrus sinensis*) en una proporción de 1:1 v/v mediante un difusor de calor o ventilación (AMPHORA, RU). Se sembraron en extensión placas de agar BHI ajustadas a pH 5,5, 7,5 ó 9,5 con 0,1 ml de cultivo durante una noche (10^7 cfu/ml) de *E. faecalis* o cepas resistentes o susceptibles a vancomicina de *E. faecium* y se colocaron en la unidad durante 24 h a 37 °C o 25 °C y se evaluaron para la inhibición.

Todas las concentraciones mediante el difusor de ventilación y las de 5, 10, 30 mg/l mediante el difusor de calor no tuvieron efecto sobre el crecimiento. La combinación del difusor de calor y 15 mg/l de la mezcla redujo el crecimiento aunque no se observó inhibición completa. El uso del difusor de calor hizo del vapor de mezcla un antimicrobiano eficaz a bajas temperaturas y también redujo la cantidad de aceite necesaria desde 50 mg/l hasta 15 mg/l, lo que demuestra usos dentro del área alimentaria/clínica como antimicrobiano en desinfección de instalaciones/equipos (especialmente ya que el vapor de mezcla a demostrado ser eficaz contra esporas) y procesamiento/envasado de productos alimenticios.

60 Ejemplo 6

Se realizó la evaluación del crecimiento *in vitro* inoculando caldo BHI con *E. faecalis* o cepas resistentes o susceptible a vancomicina de *E. faecium* (10^6 cfu/ml) e incubando a 37 °C o 25 °C en la cámara de vapor con 15

mg/l de la mezcla de EO difundida por el difusor de calor. Se tomaron muestras cada 15 minutos durante la primera hora y después cada hora durante ocho horas y de nuevo a las 24 horas. Éstas se sembraron usando agar BHI y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. El control fue el uso de los difusores sin ninguna mezcla de EO añadida. La reducción en el crecimiento de todas las cepas sobre 48 h fue de aproximadamente 0,5 log cfu/ml.

Ejemplo 7

Modelo de vapor sobre alimentos usando lechuga y pepino como ejemplos de productos frescos.

Se tomaron cuadrados de 2 cm x 2 cm de lechuga iceberg y cáscaras de pepino y se dejaron bajo luz UV durante 30 minutos para retirar cualquier microflora competidora. Las muestras se inocularon con 50 ml de μ l de cultivo durante una noche diluido con caldo BHI hasta 10^5 o 10^8 cfu/ml y se dejaron secar durante 20 minutos. Las muestras de alimento inoculado se colocaron en una cámara de vapor 6001 y se sometieron a 15 mg/l de vapor de mezcla de naranja/bergamota (la naranja/bergamota en una proporción de 1:1 v/v) mediante un difusor de calor a 25 °C durante 15, 30, 45 y 60 segundos después de una acumulación de 15 min. de vapor dentro de la cámara. Las muestras alimenticias después se colocaron en 10 ml de solución de PBS, se aguantaron durante 30 segundos, se sembraron en agar BHI y se incubaron durante 24 h a 37 °C. También se colocaron muestras no inoculadas después del tratamiento inicial de esterilización por UV en 10 ml de PBS, se aguantaron y se sembraron para evaluar los niveles restantes de contaminación.

La reducción de la contaminación de las cepas tanto resistentes como susceptibles a antibióticos sobre la lechuga y el pepino fue significativamente mayor a los 45 segundos en comparación con 15, 30 y 60 segundos. Las reducciones a los 45 segundos desde 10^5 cfu/ml y 10^8 cfu/ml sobre la lechuga fueron las siguientes: *E. faecium* susceptible a antibióticos 1,4 y 4,4 Log₍₁₀₎ cfu/ml, *E. faecalis* 2,37 y 3,85 Log₍₁₀₎ cfu/ml y en las cepas resistentes a antibióticos de *E. faecium* 2,28 y 3,8 Log₍₁₀₎ cfu/ml, *E. faecalis* 2,03 y 3,99 Log₍₁₀₎ cfu/ml. En pepino, las reducciones en la contaminación desde 10^5 /ml y 10^8 /ml desde la exposición de 45 segundos son: *E. faecium* susceptible a antibióticos 1,58 y 3,69 Log₍₁₀₎ cfu/ml, *E. faecalis* 1,05 y 4,14 Log₍₁₀₎ cfu y en cepas resistentes a antibióticos de *E. faecium* 2,06 y 3,78 Log₍₁₀₎ cfu/ml y *E. faecalis* 2,02 y 3,95 Log₍₁₀₎ cfu/ml.

Los resultados demuestran que los vapores son eficaces en reducir los niveles de contaminación de superficies de productos alimenticios frescos en un periodo de 45 segundos contra cepas tanto resistentes como susceptibles a antibióticos a bajas temperaturas teniendo de este modo aplicaciones en el procesamiento/envasado de productos frescos.

Ejemplo 8

Se expusieron pepino y lechuga a 15 mg/l del vapor de mezcla durante 45 segundos después de acumulación de 15 minutos del vapor, se realizó un procedimiento de elección forzada triangular usando un panel sensorial que constaba de un mínimo de 28 participantes, para ver si el panel podía distinguir entre esos producto alimenticios que se habían sometido a los vapores y los controles que no, se calculó el riesgo α con significancia establecida a $p = 0,05$.

No hubo diferencia significativa en el sabor del producto alimenticio tratado y no tratado siendo el riesgo α de la lechuga y el pepino de 0,62528 y 0,5157 respectivamente, lo que ilustra que el uso del vapor de mezcla sobre productos frescos no afecta al sabor.

Ejemplo 9

Se realizó una exploración de hongos del siguiente modo.

a) el vapor antimicrobiano de una mezcla de bergamota (*Citrus bergamia*) y naranja (*Citrus sinensis*) en una proporción de 1:1 v/v se ha explorado usando el método de difusión de disco contra esporas y el crecimiento de micelios contra patógenos post-recolección de, *Aspergillus niger* (ATCC 9642), *Penicillium chrysogenum* (ATCC 10106) y *Alternaria alternata* (CABI 127255) observando una inhibición del 100 % del crecimiento de micelios contra todos los organismos e inhibición (cm) del crecimiento de 5,97, 5,46 y 6,22 respectivamente contra sus esporas.

b) En espacios más grandes de 600 l la inhibición del crecimiento de micelios cuando se exponen a 15 mg/l de aire del vapor durante 15 minutos es del 44 % para *Penicillium chrysogenum*, y del 67 % y 34 % para *Aspergillus niger* y *Alternaria alternata* respectivamente.

Por tanto, el vapor de la presente invención es un agente antifúngico eficaz tanto contra células vegetativas como contra esporas. El vapor por lo tanto, tiene aplicación en el cultivo (invernaderos), procesamiento y almacenamiento de alimentos, para evitar la contaminación fúngica y la pérdida de producción por patógenos post-recolección.

Ejemplo 10

Se realizó exploración de MRSA del siguiente modo.

El vapor antimicrobiano de una mezcla de bergamota (*Citrus bergamia*) y naranja (*Citrus sinensis*) en una proporción de 1:1 v/v se ha explorado usando el método de difusión de disco contra MRSA (NCTC 13297), con una zona de inhibición de 2,7 cm.

Por tanto, este ejemplo proporciona evidencias adicionales de que el vapor de la presente invención es eficaz contra organismos resistentes a antibióticos.

Ejemplo 11

Se realizaron investigaciones sobre superficie del siguiente modo.

Se inocularon discos de acero (2 cm de diámetro) con 20 µl de cultivo durante una noche de *E. faecium* o *E. faecalis* susceptible a vancomicina o resistente a vancomicina o MRSA y se dejaron secar durante 20 minutos. Los discos después se colocaron en una cámara de vapor de 600 l y se sometieron a 15 mg/l de aire del vapor de una mezcla de bergamota (*Citrus bergamia*) y naranja (*Citrus sinensis*) en una proporción de 1:1 v/v mediante un difusor de calor durante diferentes intervalos de tiempo (15 minutos, 1, 2, 4, 15 y 24 horas). Los discos después se colocaron en vasos de precipitados cubiertos de 50 ml que contenían 5 g de perlas de vidrio (lado inoculado del disco tocando las perlas) y 10 ml de PBS y se agitaron durante 1 minuto a 150 rpm. La solución de PBS después se sembró en espiral en agar BHI, se incubaron las placas a 37 °C durante 24 horas y se determinaron los recuentos viables. Los controles fueron superficies que no se habían expuesto al vapor de mezcla de aceite esencial de naranja/bergamota.

Los resultados demostraron que el vapor era más eficaz después de exposición de 24 horas con reducciones Log₍₁₀₎ de 3,14, 1,45, 1,99, 1,81 y 1,78 para *E. faecalis* susceptible a vancomicina, *E. faecium* susceptible a vancomicina, *E. faecium* resistente a vancomicina, *E. faecalis* resistente a vancomicina y MRSA respectivamente.

Por tanto, el vapor de la presente invención puede reducir la carga bacteriana sobre superficies en un área tanto clínica como alimentaria en un 99 % a un 99,9 % contra bacterias tanto resistentes como susceptibles a antibióticos en 24 h.

Mecanismos de acción

Se han realizado estudios preliminares del mecanismo de acción de los vapores de mezcla contra *E. faecium* y *E. faecalis* susceptible a antibióticos. Las células se evaluaron antes y después de exponerse a 15 mg/l del vapor de mezcla durante 1 hora a 37 °C mediante un difusor de calor. Los métodos para el mecanismo de acción incluyeron:

- Evaluación de la permeabilidad de membrana con un ensayo NPN
- Determinación de concentraciones intra y extracelulares de ATP usando el kit de ensayo de luminescencia FLAA-1 KT (Sigma, RU)
- Influencia de los vapores de mezcla sobre el potencial de membrana y las mediciones de pH intracelular usando fluorescencia de 3,3-dipropiltiacarbocianina y succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína respectivamente.
- El uso de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para evaluar cambios morfológicos en la célula.

Las investigaciones demostraron que los vapores aumentaban la permeabilidad celular en 32-40 veces, el potencial de membrana de las células se reduce de 35-12,61 a.u. y 45-14,97 a.u. en *E. faecium* y *E. faecalis* respectivamente. La permeabilidad aumentada de las células y la pérdida de potencial de membrana conduce a pérdida de ATP intracelular tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium* desde aproximadamente 35 pmol/mg de proteína hasta niveles indetectables. Esto está acoplado con una disminución en el pH intracelular en *E. faecium* desde pH 6,34 hasta 5,32 y en *E. faecalis* desde pH 6,51 hasta 4,25. Suceden cambios morfológicos en las células incluyendo una pérdida de la distinción de la membrana y una forma alargada.

Sin el deseo de limitarse por teoría alguna, los resultados indican que uno de los posibles modos de acción de los vapores de mezcla de cítricos contra los microorganismos es a través del aumento de la permeabilidad de la membrana celular.

REIVINDICACIONES

1. Un vapor de una mezcla que consiste en el aceite de naranja (*Citrus sinensis*) y el aceite de bergamota.

5 2. Un vapor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vapor comprende los siguientes componentes: metanol, etanol, acetona, isopropanol, amina de ácido fluoroacético, fluoruro de trimetilsililo, dimetilsilanodiol, 3-heptanona, butilacetato, n-octanal, p-cimeno, limoneno, alfa-pineno, alfa-felandreno, canfeno, tuyeno, beta pineno, mirceno, careno, nonanal, nonanol, citral, linalool, 1-fluorododecano, bergamol e isobutirato de linalilo.

10 3. Un vapor de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el aceite de naranja y el aceite de bergamota están presentes en la mezcla en una proporción de 1:1 en volumen:volumen.

4. Un vapor de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde el vapor tiene los siguientes 20 componentes principales de acuerdo con GCMS:

15

Componentes	m/z**	Recuentos/min
Metanol	33	1279
Etanol	47	391
Acetona	59	71682
Isopropanol	60	2236
Amina de ácido fluoroacético	77	4505
Fluoruro de trimetilsililo	92	58*
Dimetilsilanodiol	92	58*
3-heptanona	114	43
Butilacetato	116	110
n-octanal	128	57
p-cimeno	134	342
Limoneno	136	54440*
Alfa-pineno	136	54440*
Alfa-felandreno	136	54440*
Canfeno	136	54440*
Tuyeno	136	54440*
Beta pineno	136	54440*
Mirceno	136	54440*
Careno	136	54440*
Nonanal	142	36
Nonanol	144	36
Citral	154	186*
Linalool	154	186*
1-Fluorododecano	188	27*
Bergamol	196	26
Isobutirato de linalilo	224	25

* Pico combinado para todos los componentes del mismo peso molecular.
 ** m/z = proporción de masa a carga

5. Un proceso para preparar un vapor de una mezcla que consiste en el aceite de naranja (*Citrus sinensis*) y el aceite de bergamota definidos en cualquier reivindicación anterior, comprendiendo el proceso calentar la mezcla hasta una temperatura de 30 a 50 °C durante un periodo de tiempo que varía de 10 minutos a 20 minutos, calentando preferiblemente la mezcla caliente durante 15 minutos.

20

6. Uso de un vapor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como antimicrobiano, en donde el vapor es antimicrobiano contra bacterias.

25 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las bacterias son bacterias resistentes a antibióticos.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las bacterias se seleccionan entre *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Arcobacter butzleri*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* y MRSA, preferiblemente las bacterias *Enterococcus faecium* son *Enterococcus faecium* NCTC 07171 y/o *Enterococcus faecium* NCTC 12202 y preferiblemente las bacterias *Enterococcus faecalis* son *Enterococcus faecalis* NCTC 12697 y/o *Enterococcus faecalis* NCTC 12203.

30

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las bacterias son bacterias que albergan esporas, preferiblemente las bacterias que albergan esporas son *Clostridium difficile* y/o *Bacillus cereus*.

35

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el vapor es capaz de destruir o inhibir el crecimiento de las esporas.
- 5 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que las bacterias están presentes en un producto alimenticio y en el que el vapor se usa durante el procesamiento, envasado y/o almacenamiento del producto alimenticio.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el producto alimenticio es ensalada, hortalizas y/o frutas.
- 10 13. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 ó 12, en el que el producto alimenticio se somete al vapor durante un periodo de tiempo que varía de 30 segundos a 1 minuto, preferiblemente el producto alimenticio se somete al vapor durante un periodo de tiempo de 45 segundos.
- 15 14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el vapor se usa para la desinfección del aire y/o de los equipos en un entorno de industria alimentaria o se usa para la desinfección del aire y/o de los equipos en un entorno clínico.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el vapor es antimicrobiano contra patógenos vegetales, preferiblemente el vapor se usa en un invernadero.