

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 681**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/90** (2006.01)  
**A01N 47/44** (2006.01)  
**A01N 25/30** (2006.01)  
**A01P 1/00** (2006.01)  
**A01P 3/00** (2006.01)  
**A23C 19/11** (2006.01)  
**A23L 3/3463** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07803625 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2184991**

54 Título: **Combinaciones de un fungicida poliénico con un tensoactivo catiónico**

30 Prioridad:

**13.09.2007 ES 200702132**

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

**23.11.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 551 681 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**

Combinaciones de un fungicida poliénico con un tensoactivo catiónico.

5 *Campo de la Invención*

La presente invención se refiere a combinaciones del fungicida poliénico natamicina con el tensoactivo catiónico LAE con propiedades antimicrobianas para mejorar la actividad protectora de ambos compuestos contra los microorganismos responsables del deterioro de alimentos y de productos cosméticos y farmacéuticos.

10

*Estado de la técnica*

15

Se sabe en la técnica que los productos alimentarios son susceptibles de actuar como caldo de cultivo para los microorganismos, lo que constituye un riesgo para la salud humana. Las enfermedades de origen alimentario siguen siendo un auténtico problema tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, causando un gran sufrimiento humano y cuantiosas pérdidas económicas. Así pues, los productos alimentarios necesitan una buena protección contra la contaminación microbiana.

20

El fungicida poliénico natamicina (Nº CAS 7684-93-8), también conocido como pimarcina, es un agente antimicrobiano de origen natural producido por la bacteria *Streptomyces natalensis*. Este compuesto es eficaz contra las levaduras y los mohos, pero ineficaz contra las bacterias. Se usa en la industria alimentaria como conservante para inhibir el desarrollo fúngico (aprobado en la Comunidad Europea como E-235 y en E.E.U.U. está regulado por 21 CFR 172.155). Durante más de 20 años se ha usado la natamicina para impedir el crecimiento de moho en el queso y las salchichas. Además, se usa también en otros productos alimentarios susceptibles de contaminación microbiológica, como los aderezos, las salsas, los escabeches, los condimentos, las pastas para untar, la margarina y los productos lácteos.

25

30

La falta de solubilidad de los fungicidas poliénicos en diversos disolventes (tanto acuosos como orgánicos) restringe en gran medida su uso. Debido a la inestabilidad de los fungicidas poliénicos en solución, se sabe que es imposible obtener una solución de fungida poliénico (EP 0 678 241 B1). La solubilidad de la natamicina en el agua es muy baja, del orden de 0,005-0,010% (peso/peso).

35

Por esta razón, la natamicina se ha aplicado a los alimentos en diversas formas, por ejemplo, en forma seca, en suspensiones acuosas, mezclando natamicina con disolventes miscibles en agua para obtener una solución acuosa estable, etc. El uso de la forma seca supone la dificultad de obtener una distribución homogénea. El uso de la suspensión acuosa supone la formación de precipitados debido a la baja estabilidad de la natamicina. Se han hecho varios intentos para hacer solubles los fungicidas poliénicos como la natamicina con el objetivo de mejorar su eficacia.

40

La patente EP 0 670 676 B1 se refiere a un nuevo tipo de preparado de natamicina que supone una forma modificada de natamicina mediante el contacto de natamicina con metanol para convertir la natamicina en una forma solvatada y a continuación eliminar el metanol para formar  $\delta$ -natamicina. Los inventores descubrieron de modo sorprendente que la  $\delta$ -natamicina posee un mejor comportamiento de disolución.

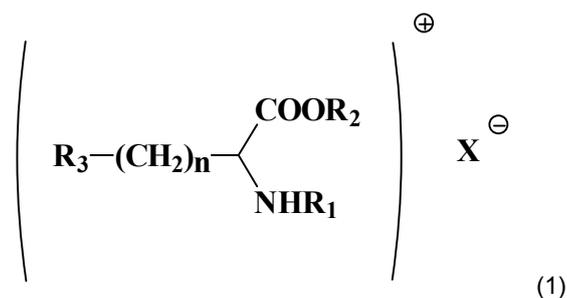
En la patente EP 0 678 241 B1 se da a conocer una suspensión acuosa de natamicina que contiene un agente espesante y tiene un pH entre 3 y 6. Aplicando una gama adecuada de pH junto con un agente espesante, los inventores obtuvieron una suspensión acuosa de natamicina química y microbiológicamente estable durante más de 14 días y físicamente estable durante varias horas.

5 La patente US 5,597,598 se refiere a una composición que comprende un agente antifúngico, como la natamicina, un compuesto antifúngico ácido y un compuesto ácido adicional. Esta composición es útil para impedir el desarrollo de mohos que son más tolerantes con los fungicidas poliénicos. Esta composición se puede incorporar a una emulsión de soporte o a un líquido donde los alimentos y los productos agrícolas que haya que tratar pueden ser cepillados con la emulsión de soporte o quedar inmersos en el líquido.

10 La patente US 6,146,675 se refiere a una nueva composición antimicrobiana que comprende natamicina, un captador de oxígeno o antioxidante y/o de un agente quelante. La dureza del agua se controla para mantener la actividad de la natamicina impidiendo su degradación. WO2005097063 se refiere a un procedimiento y una formulación específicos para producir comprimidos de natamicina y facilitar su preparación y uso en la industria alimentaria y forrajera y asegurar que dichos comprimidos se desintegren rápida y totalmente al añadirlas a un vehículo líquido.

15 Por otra parte, los tensoactivos catiónicos son conocidos como conservantes usados en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Los tensoactivos catiónicos han resultado ser altamente eficaces contra la proliferación microbiana, al mismo tiempo que suponen una ingesta segura para los humanos y mamíferos. Por todo ello, los tensoactivos catiónicos constituyen una atractiva herramienta para la industria.

Se ha demostrado que los tensoactivos catiónicos según la fórmula (1) derivados de la condensación de ácidos grasos y aminoácidos dibásicos esterificados son sustancias altamente eficaces contra los microorganismos.

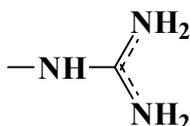


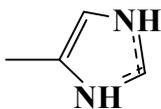
25 donde:

X<sup>-</sup> es un contra ión derivado de un ácido inorgánico u orgánico, preferiblemente Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, o HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>

R<sub>1</sub>: es una cadena alquílica lineal de un hidroxiaácido o un ácido graso saturado de 8 a 14 átomos de carbono ligado al grupo α-aminoácido mediante un enlace amida, y

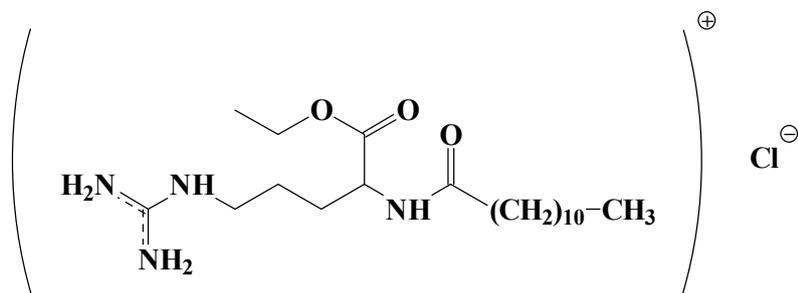
30 R<sub>3</sub>: es:





donde n es de 0 a 4.

En particular, el éster etílico de la lauramida del monohidrocloruro de arginina, al que en adelante se denominará LAE (N° CAS 60372-77-2), es actualmente bien conocido como agente antimicrobiano. En la práctica, el uso del LAE ha resultado ser bien tolerado por los seres humanos, mostrando un índice de toxicidad muy bajo. El LAE tiene la estructura química de la fórmula (2) que se muestra a continuación:



(2)

10 El compuesto LAE es notable por su actividad con diferentes microorganismos, como las bacterias, las levaduras y los mohos que pueden estar presentes en productos alimenticios (WO 03/034842) y también en fórmulas y preparados cosméticos (WO 03/013453, WO 03/013454 y WO 03/043593). Se destaca la inocuidad de este producto para los seres humanos.

15 La preparación general de los tensoactivos catiónicos se describe en la patente española ES 512643 y en las solicitudes de patente internacional WO 96/21642, WO 01/94292 y WO 03/064669.

Se conocen interacciones entre los tensoactivos catiónicos y otras moléculas. En WO 03/094638 se describe una combinación de los tensoactivos catiónicos con hidrocoloideos aniónicos; esta combinación conlleva la generación

20 de productos sólidos que contienen aproximadamente cantidades estequiométricas del tensoactivo catiónico y del hidrocoloide aniónico. En US 7,074,447 y EP 1 450 608 B1 se describe una combinación más de los tensoactivos catiónicos, combinación que se refiere a sorbato potásico, sorbato de calcio o ácido sórbico, que han resultado ser muy eficaces en la conservación de alimentos. Los sistemas conservantes descritos en US 7,074,447 y EP 1 450 608

25 B1 se caracterizan por su actividad sinérgica.

Se ha descubierto recientemente que la actividad antimicrobiana de las combinaciones de LAE y los demás compuestos definidos en la fórmula (1) con la mayoría de los conservantes comunes, iónicos y no iónicos, que se usan para proteger los productos alimentarios y también las formulaciones y preparados cosméticos es más

30 elevada que la actividad mostrada por cada uno de los componentes cuando se usan por separado en la misma dosificación. Se ha observado sinergismo cuando se reducen las cantidades de los componentes de los compuestos de la fórmula (1) y de los demás antimicrobianos. De esta forma, se ha reducido también los efectos tóxicos adversos y/o la irritación y/o la alergia provocada por las combinaciones de conservantes.

5 El LAE, conocido también como arginato láurico, es elaborado por Laboratorios Miret, S.A., (LAMIRSA, España). El arginato láurico aparece listado por la FDA (Food and Drug Administration) como sustancia GRAS (Generally Recognized As Safe, [*Reconocida generalmente como segura*]) en el documento GRN 000164. El USDA (United States Department of Agriculture [*Ministerio de Agricultura de Estados Unidos*]) ha aprobado su uso en los productos cárnicos y avícolas (Directiva FSIS 7120.1).

En los documentos WO 2006/084553 A1 y WO 2004/082407 A1 se describen composiciones alimentarias en las que están presentes al mismo tiempo LAE y natamicina.

10 En el documento WO 2007/112379 A1 se describen combinaciones de LAE con un antibiótico seleccionado entre antibióticos  $\beta$ -lactama, polipéptidos y quinolonas.

15 Existe la necesidad de proporcionar una solución acuosa estable de natamicina con el fin de mejorar su aplicación en una distribución homogénea para el tratamiento de productos alimentarios, de dispositivos para preparar productos alimentarios, de dispositivos médicos o productos cosméticos y de sanitarios donde el desarrollo de microorganismos es habitual.

20 Existe también la necesidad de un procedimiento para la preparación de una solución acuosa estable de natamicina que sea eficaz y fácil y permita la preparación de soluciones de cualquier concentración adecuada.

#### *Resumen de la Invención*

25 La invención proporciona una composición sólida que consiste en el fungicida poliénico natamicina y LAE (representado por la fórmula (2) anterior).

La invención proporciona también un método para preparar una dispersión de natamicina mediante la dispersión de la composición sólida, según la invención en un medio líquido adecuado.

30 La invención proporciona también una dispersión de natamicina preparada mediante el método de la invención.

Finalmente, la invención proporciona un método para preparar una solución acuosa de natamicina diluyendo la dispersión en agua.

35 La invención resuelve los problemas de la solubilidad generalmente baja de la natamicina al proporcionar una composición acuosa constituida por un tensoactivo catiónico de fórmula (2), que encapsula el fungicida poliénico natamicina. Esta composición mejora sorprendentemente la actividad de la natamicina porque aumenta la biodisponibilidad de la natamicina en la fase acuosa, que es el medio donde crecen los microorganismos. La encapsulación de natamicina en un tensoactivo catiónico es una forma de evitar que precipite. Al mismo tiempo mejora su disponibilidad en la matriz donde se aplica la solución acuosa. De forma inesperada, una vez que el  
40 tensoactivo catiónico encapsula la natamicina en la solución acuosa, el fungicida poliénico es liberado en la matriz donde se aplica la solución acuosa, en un nivel de dosis que siempre está solubilizado, es estable y es mucho más eficaz.

Los fungicidas poliénicos son en general eficaces contra las levaduras y los mohos, pero ineficaces contra las bacterias. Los tensoactivos catiónicos, debido a sus propiedades catiónicas, se unen fácilmente a las membranas de las bacterias. Los inventores observaron que, de forma inesperada, tras encapsular natamicina en LAE en solución acuosa se produjo un efecto antimicrobiano sinérgico.

5

La encapsulación de natamicina en LAE proporciona una solución acuosa que es estable y eficaz contra las levaduras, los mohos y las bacterias, a la vez que sorprendentemente, se observa un efecto sinérgico.

*Descripción de las realizaciones preferidas*

10

Los presentes inventores han descubierto que es posible suministrar una composición sólida consistente esencialmente en el fungicida poliénico natamicina y el tensoactivo catiónico de la fórmula (2) anteriormente descrita.

15

El tensoactivo catiónico que se usa en la presente invención es el éster etílico del arginato láurico de la fórmula (2) anteriormente descrita (que en adelante se denominará LAE).

El segundo componente de la composición sólida es el fungicida poliénico natamicina.

20

La composición sólida puede contener componentes adicionales tales como azúcar, sal, antiapelmazantes, antioxidantes, agentes quelantes, agentes tensoactivos y agentes espesantes. La función de dichos componentes adicionales es estabilizar la composición sólida, por ejemplo, la presencia de un antioxidante puede contribuir a prolongar la estabilidad de almacenamiento de la composición sólida. Los componentes adicionales pueden tener también la función de mejorar la forma dispersa de la composición sólida o su solución más diluida en agua; siendo la forma dispersa y la solución las formas procesadas preferidas de la composición sólida que se explicarán más adelante.

25

La presencia de los componentes adicionales puede facilitar la preparación de la forma dispersa del fungicida poliénico por simple dispersión en un disolvente, sin necesidad de añadir ningún suplemento más.

30

Del mismo modo, la presencia de los componentes adicionales puede facilitar la preparación de la solución acuosa del fungicida poliénico, sin necesidad de proporcionar ninguna solución específica en agua para la preparación de la solución, el agua sola puede ser suficiente para lograr el efecto deseado.

La composición sólida consiste esencialmente en natamicina y LAE.

35

La cantidad de los dos componentes, natamicina y LAE, puede variar dependiendo del uso previsto. Puede que convenga aumentar relativamente la cantidad de natamicina de la composición sólida, o aumentar relativamente la cantidad de LAE de la composición sólida.

40

La preparación de la dispersión de natamicina que se describe a continuación supone la dispersión simple en un disolvente adecuado.

La preparación de la solución de natamicina supone la posterior dilución de la dispersión en agua o la disolución de la composición sólida en agua.

En ninguna de estas preparaciones se prevé un posterior añadido del fungicida poliénico o del tensoactivo catiónico. Así pues, las cantidades relativas finales de natamicina y de LAE en la dispersión y en la solución quedan determinadas ya por su presencia relativa en la composición sólida proporcionada inicialmente. En el

posterior tratamiento de la composición sólida con el método de dispersión o solución se puede añadir en la práctica más natamicina o LAE, pero este añadido posterior complicaría necesariamente el método de preparación y no constituye el método elegido de la invención.

- 5 La mezcla de LAE y de natamicina puede consistir en un 2,0-99,9% en peso de LAE y un 0,1- 98,0% en peso de natamicina, siendo la suma de los dos 100%.

Las mezclas preferidas de LAE y de natamicina abarcan una amplia gama de mezclas, porque cada gama tiene un efecto específico.

- 10 Por ejemplo, la mezcla formada por un 99,0% de LAE y un 1,0% de natamicina es preferida para ser usada en aquellos productos alimentarios donde la presencia inicial de microorganismos como las levaduras y los mohos se dé en baja concentración. La mezcla permite que la natamicina ejerza un efecto constante contra los microorganismos.

- 15 Otra de las mezclas preferidas tiene como finalidad el curado de productos alimentarios donde el procedimiento de curado es corto, pero donde la concentración inicial de levaduras y mohos es muy alta. La mezcla preferida consta de un 2% de LAE y de un 98% de natamicina. Gracias a esta mezcla se reduce considerablemente la alta concentración de levaduras y mohos al comienzo del proceso de curado, evitando, en este sentido, el ataque inicial de estos microorganismos al alimento.

- 20 Hay otra mezcla preferida que se caracteriza por una relación 1:1 entre LAE y natamicina. Esta mezcla es preferida para aquellos productos que están sujetos a un corto período de curado donde la concentración inicial de microorganismos es baja, o a un largo período de curado cuando la concentración inicial de microorganismos es alta.

- 25 La composición puede contener además una cantidad de ingredientes adicionales, como se ha explicado antes. La cantidad de los ingredientes adicionales depende del uso final que se pretenda dar a la dispersión sólida. Una cantidad normal de los ingredientes adicionales estaría en el orden de 0 a 5 partes en peso sobre un total de 100 partes en peso de la mezcla de natamicina y LAE.

- 30 La composición sólida puede prepararse usando métodos convencionales de preparación. Un método adecuado consiste en introducir los dos componentes en una mezcladora de sólidos y mezclarlos durante el tiempo necesario hasta que se obtenga una mezcla homogénea. Si se prevé que estén presentes componentes adicionales, éstos se pueden añadir juntos con el LAE y la natamicina, o se pueden añadir después de que se haya obtenido la mezcla homogénea. La composición que finalmente se obtiene es una sustancia pulverulenta.

- 35 La composición sólida puede almacenarse durante un prolongado período de tiempo sin necesidad de adoptar medidas de prevención específicas. Se recomienda generalmente almacenar las composiciones sólidas en condiciones de baja humedad y a una temperatura que no sobrepase los 20°C, pero también se las puede almacenar durante mucho tiempo en condiciones fuera de la gama preferible.

- 40 La composición sólida de la invención es especialmente apropiada para ser usada para la preparación de una dispersión de natamicina en cualquier líquido adecuado. La dispersión se define como con un líquido que contenga partículas de un tamaño de 50 µm a 10 nm. Puede que la dispersión tenga una cierta turbiedad, que podría ser de tal grado que le diera un aspecto lechoso. El aspecto final de la dispersión está determinado por el

tamaño y la concentración de las partículas en el líquido dispersante. La dispersión puede considerarse como una preparación concentrada de natamicina, al estar la concentración muy por encima de la gama en la que se usaría la natamicina como agente antimicrobiano en productos alimentarios.

5 La base líquida de la dispersión puede ser cualquiera de los líquidos adecuados para la preparación de alimentos. Dichos líquidos son el agua, propilenglicol, etanol o glicerina. También son aceptables las mezclas de dichos líquidos.

10 Como agua se puede entender agua del grifo, agua desmineralizada, agua destilada o soluciones de cualquier sal adecuada en agua.

Particularmente la preferida es el agua del grifo.

15 La fase dispersa en la dispersión consiste esencialmente en LAE y natamicina. También puede contener los ingredientes adicionales, si éstos se hallan presentes. Como alternativa, los ingredientes adicionales se pueden haber disuelto en el líquido que se usa para la preparación de la dispersión.

20 La preparación de la dispersión es particularmente fácil. El líquido que se ha seleccionado para el paso de dispersión se añade a la composición sólida, o bien la composición sólida se añade al líquido. Posteriormente se agita la mezcla durante el tiempo que sea necesario para obtener la dispersión deseada. Puede darse el caso que no se observen partículas restantes. El grado deseado de dispersión se puede controlar mediante métodos convencionales, como la turbidimetría.

25 Una dispersión de natamicina preparada de esta manera puede mostrar una concentración de éste fungicida poliénico entre 100 ppm y 10.000 ppm, opcionalmente comprendiendo ingredientes tales como como azúcar, sal, antiapelmazantes, antioxidantes, agentes quelantes, agentes tensoactivos y agentes espesantes.

30 La concentración de natamicina en la dispersión puede variar entre 100 ppm y 5.000 ppm. La concentración correspondiente de LAE en la dispersión depende de la presencia relativa de los dos componentes en la dispersión sólida.

35 Uno de los aspectos sorprendentes de la presente invención es que la dispersión de natamicina presenta un alto grado de estabilidad. La dispersión puede almacenarse durante más de 12 meses sin que se observe la incidencia de precipitación y sin pérdida alguna de su aspecto óptico original: una dispersión que al principio es ligeramente turbia seguirá siendo así transcurridos 12 meses. La dispersión debe almacenarse en recipientes cerrados, pero si no, no hace falta ningún tratamiento especial durante el almacenamiento.

40 La principal ventaja de la dispersión de la invención del fungicida poliénico natamicina es que constituye la base adecuada para la posterior preparación posterior de una solución del fungicida poliénico en agua. La solución del fungicida poliénico en agua es la preparación que constituye la preparación idónea para el tratamiento de productos alimentarios. El uso típico de la natamicina es el tratamiento del queso. Es muy apropiado preparar un baño adecuado en el que floten los quesos durante un tiempo determinado hasta que se consiga el efecto deseado. La invención, por lo tanto, proporciona el método para preparar una solución de natamicina diluyendo en agua la dispersión de natamicina que se describe más arriba. Esta preparación resulta especialmente fácil y cómoda. La dispersión, según la invención se añade al recipiente que contiene agua, o, alternativamente, se

## ES 2 551 681 T3

añade agua a un recipiente que ya contenga la dispersión. La mezcla debe agitarse hasta que se obtenga una solución homogénea. El tiempo de agitación no es especialmente largo; agitar con un dispositivo de agitación convencional durante 10 a 20 minutos suele ser suficiente para conseguir la solución homogénea.

5 La solución que se obtiene es clara y normalmente no se observa precipitado alguno ni se acepta turbiedad alguna. No obstante, en algunas ocasiones puede aparecer un cierto grado de turbiedad o un ligero precipitado, que en todo caso es totalmente aceptable, ya que es considerablemente más bajo que en una muestra con sólo natamicina.

10 También es posible preparar la solución procesando inmediatamente la composición sólida en un volumen correspondiente de agua y de conformidad con ello omitir la etapa del almacenamiento por separado en forma de dispersión. Esto suele ser menos conveniente que la preparación de la solución sobre la base de la dispersión; puede ser necesaria una agitación extensiva de considerable duración para obtener el resultado deseado y el control del resultado final es menos fácil si se compara con la dilución de la dispersión.

15 Y, desde luego, también es posible preparar la solución acuosa a partir de los componentes mismos, la natamicina y el LAE, añadiendo estos componentes a una cantidad adecuada de agua y agitando hasta que se consiga la homogeneidad. Para esta forma de preparación es aconsejable que el LAE se añada inicialmente a la fase líquida y que el fungicida poliénico se añada en el segundo paso. La forma de preparación es menos adecuada y supone una considerable energía de agitación, pero es posible y puede conducir al mismo resultado final.

20 La estabilidad de la solución es alta. La preparación de una solución mediante la dilución de la dispersión ha mostrado que la solución es estable durante 6 meses. Por lo tanto, la solución puede prepararse inmediatamente, pero normalmente la preparación intermedia de la dispersión más concentrada soluciona muchos problemas de almacenamiento prácticos.

25 La concentración final de los componentes, la natamicina y el tensoactivo catiónico LAE, en la solución acuosa viene determinada por la concentración de estos componentes en la preparación a partir de la cual se prepara la solución acuosa.

30 La solución acuosa puede contener natamicina en una concentración de 100 a 10.000 ppm en combinación con LAE en una cantidad de 200 a 100.000 ppm y opcionalmente comprender ingredientes tales como azúcar, sal, antiapelmazantes, antioxidantes, agentes quelantes, agentes tensoactivos y agentes espesantes.

35 De acuerdo con una realización preferida la solución acuosa contiene los dos componentes en una relación en peso de natamicina a LAE de 1:20 a 1:200, preferentemente de 1:50 a 1:100.

40 De acuerdo con otra realización preferida la solución acuosa según la presente invención contiene natamicina a una concentración de un 0,001 a un 0,15% (p/p), preferentemente de un 0,01 a un 0,10 % (p/p).

La mezcla de natamicina (disponible en el mercado) con un tensoactivo catiónico como el LAE solubilizó de forma sorprendente la natamicina en una solución acuosa. Según el nivel de dosis entre la natamicina y el LAE, se observó la total solubilidad de la natamicina. La solución acuosa obtenida tenía una baja viscosidad, ya que

no hay necesidad de añadir a la solución gomas u otras sustancias espesantes para estabilizar la natamicina. Esta baja viscosidad mejora el proceso de aplicación de la solución en el producto que se desea tratar.

5 La siguiente tabla muestra la relación entre la natamicina y el LAE para conseguir la solubilidad de la natamicina en una solución acuosa:

Natamicina (ppm)	LAE (ppm)	Relación	Estado de la solución acuosa
100	3.000	1:30	Ligero Precipitado
100	5.000	1:50	Solubilidad
100	50.000	1:500	Solubilidad
250	10.000	1:40	Ligero Precipitado
250	20.000	1:80	Solubilidad
500	30.000	1:60	Ligero Precipitado
500	45.000	1:90	Solubilidad
1.000	100.000	1:100	Solubilidad

10 Los resultados muestran que la natamicina se solubilizó mejor cuando se mezcló con las dosis más altas del LAE. La solubilidad de la natamicina depende de la concentración. Una alta concentración de natamicina supone una alta concentración del LAE para solubilizar la natamicina.

Los inventores han observado que un 10% de LAE en agua permitió solubilizar más de 1.000 ppm de natamicina.

15 Otro efecto sorprendente de la presente invención es que la combinación de natamicina con el LAE presenta un efecto biológico que es mejor de lo esperado sobre la base del conocimiento de los efectos manifestados por los componentes por separado.

20 La solución de la combinación de natamicina con el LAE es adecuada para el tratamiento de productos alimentarios. Toda clase de productos alimentarios que se traten con natamicina pueden tratarse con la combinación de la presente invención.

Los productos alimentarios que pueden tratarse son productos como el queso, los productos cárnicos, en particular fiambres y productos de panadería. La aplicación de la solución acuosa se efectúa mediante inmersión o pulverización; la elección del método de aplicación depende de la clase de producto que se va a tratar.

25 Otros productos que se pueden tratar son las bebidas. En este caso la aplicación se efectúa añadiendo la composición de la invención a bebidas como el zumo de naranja.

30 Otras aplicaciones pueden referirse a productos no pensados para ser ingeridos. Por ejemplo, los productos cosméticos pueden ser tratados por pulverización con la solución acuosa o por añadiendo directamente la composición de la invención al producto.

Y finalmente, cada uno de los productos de la invención, esto es, la composición sólida, la dispersión y la solución acuosa, pueden usarse para la elaboración de preparados farmacéuticos para el tratamiento de seres

humanos o animales, estando destinado este tratamiento a cualquier clase de enfermedad en relación con infecciones provocadas por bacterias u hongos.

#### EJEMPLOS

5

##### Ejemplo 1

Se colocaron 198 g de LAE (elaborado por LAMIRSA) en una mezcladora de sólidos (fabricada por ORTOALRESA). Se añadieron 2 g de natamicina (elaborada por Sigma). Los dos componentes se mezclaron en la mezcladora de sólidos a 60 rpm durante 30 minutos.

##### Ejemplo 2

Se colocaron 196 g de natamicina (elaborada por Sigma) en una mezcladora de sólidos (fabricada por ORTOALRESA). Se añadieron 4 g de LAE (elaborado por LAMIRSA). Los dos componentes se mezclaron en la mezcladora de sólidos a 60 rpm durante 30 minutos.

##### Ejemplo 3

Se colocaron 100 g de LAE (elaborado por LAMIRSA) en una mezcladora de sólidos (fabricada por ORTOALRESA). Se añadieron 100 g. de natamicina (elaborada por Sigma). Los dos componentes se mezclaron en la mezcladora de sólidos a 60 rpm durante 30 minutos.

##### Ejemplo 4

Se colocaron 400 g de una mezcla según el ejemplo 1 en un recipiente y se añadieron 600 ml de agua corriente.

Se agitó la mezcla durante 30 minutos con un agitador (fabricado por HEIDOLPH) a temperatura ambiente.

Al final del proceso de agitación se obtuvo un líquido turbio de color blanco.

La concentración de LAE en la dispersión fue de un 39,6% en peso (p/p).

La concentración de natamicina en la dispersión fue de un 0,4% en peso (p/p).

Ambas concentraciones se determinaron mediante HPLC.

##### Ejemplo 5

Se colocaron 200 g de una mezcla según el ejemplo 2 en un recipiente y se le añadieron 800 ml de agua corriente.

Se agitó la mezcla durante 30 minutos con un agitador (fabricado por HEIDOLPH) a temperatura ambiente.

Al final del proceso de agitación se obtuvo un líquido turbio de color blanco.

La concentración de natamicina en la dispersión fue de un 19,6% en peso (p/p).

La concentración de LAE en la dispersión fue de un 0,4% en peso (p/p).

Ambas concentraciones se determinaron mediante HPLC.

##### Ejemplo 6

Se colocaron 200 g de una mezcla según el ejemplo 2 en un recipiente y se le añadieron 800 ml de agua corriente.

Se removió la mezcla durante 30 minutos con un agitador (fabricado por HEIDOLPH) a temperatura ambiente.

5 Al final del proceso de mezcla se obtuvo un líquido de color blanco.

La concentración de LAE en la dispersión fue de 10,0% en peso (p/p).

La concentración de natamicina en la dispersión fue de 10,0% en peso (p/p).

Ambas concentraciones se determinaron mediante HPLC.

10 Ejemplo 7

Se preparó una solución acuosa de natamicina añadiendo 1.000 g de la dispersión del ejemplo 4 a 1.000 g de agua corriente. El líquido resultante se agitó durante 30 minutos.

La solución obtenida era clara, con un ligero color blanquecino.

15 La concentración de LAE en la solución fue de un 19,8% en peso (p/p).

La concentración de natamicina en la solución fue de un 0,2% (p/p).

La solución que se obtuvo se usó para el tratamiento de queso fresco.

20 Ejemplo 8

Se preparó una solución acuosa de natamicina añadiendo 10 g de la dispersión del ejemplo 5 a 970 g de agua. El líquido resultante se agitó durante 30 minutos.

La solución obtenida era clara, con un ligero color blanquecino.

25 La concentración de natamicina en la solución fue de un 0,2% en peso (p/p).

La concentración de LAE en la solución fue de un 0,004% (p/p).

La solución que se obtuvo se usó para el tratamiento de queso curado.

30 Ejemplo 9

Se preparó una solución acuosa de natamicina añadiendo 10 g de la dispersión del ejemplo 6 a 490 g de agua corriente. El líquido resultante se agitó durante 30 minutos.

35 La solución obtenida era clara.

La concentración de LAE en la solución fue de un 0,2% en peso (p/p).

La concentración de natamicina en la solución fue de un 0,2% (p/p).

La solución que se obtuvo se usó para el tratamiento de queso semicurado.

40

Ejemplo 10

Se compró queso curado a un productor local.

El queso contenía leche de vaca, leche de oveja, leche de cabra, fermentos, sal y cuajo. Cantidad mínima de grasa 55% en peso seco. Mínimo de peso seco 45.

Arginato láurico (de LAMIRSA) con una pureza del 90% Etil-N<sup>o</sup> –lauril-L-arginato HCl.

5

Natamicina: 95% en peso seco, disponible en el mercado.

El inóculo es una mezcla de *Penicillium caseicolum*, *Rizopus*, *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporioides*. Esporas sembradas en agar Sabourad Cloranfenicol se incubaron a 25°C durante 5 días. Se rasparon esporas del agar con caldo Ringer y se diluyó en caldo de cerebro-corazón . El caldo de cerebro-corazón se incubó a 25°C durante 5 días. Los inóculos diluidos se mezclaron en la concentración deseada para tener inóculos de la mezcla.

10

Con el fin de preparar el baño de natamicina con arginato láurico, primero se diluyó el LAE en agua desionizada y, una vez disuelta, se introdujo natamicina y se dejó el líquido en agitación durante un mínimo de 30 minutos.

15

Se cortó el queso en rodajas en porciones iguales de 5 centímetros de diámetro por 5 milímetros de grosor en ambiente estéril.

20

Se sumergieron las porciones de queso en el baño durante 5 segundos. Se las dejó gotear y se las secó durante 5 minutos en una superficie estéril. A continuación se le inoculó a cada muestra *Penicillium caseicolum*, *Rizopus*, *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporioides* en concentración deseada de 4 log UFC/g.

#### TRATAMIENTOS

25

Concentraciones de natamicina al 95%: se prepararon dos baños de natamicina a diferente concentración: 500 ppm y 1.000 ppm.

Concentraciones de arginato láurico: se prepararon cuatro baños de arginato láurico a diferente concentración: 0,5%, 1%, 5% y 10%.

30

Concentraciones de arginato láurico con natamicina al 95%: se prepararon baños mixtos de arginato láurico y natamicina a diferente concentración.

35

Todos los tratamientos se compararon entre ellos y con un control no tratado.

1. Control
2. Natamicina a 500 ppm
3. Natamicina a 1.000 ppm
4. LAE al 0,5%
5. LAE al 1%
6. LAE al 5%
7. LAE al 10%
8. Natamicina a 500 ppm + LAE al 0,5%
9. Natamicina a 500 ppm + LAE al 5%

40

45

Temperatura de almacenamiento: las muestras se mantuvieron a 22°C.

Análisis: medir el efecto microbiocida de las muestras tratadas con arginato láurico y natamicina sobre *Penicillium caseicolum*, *Rizopus*, *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporioides*. El análisis (Agar Rose Bengal, 25°C, 5 días) se llevó a cabo al inicio del estudio, a los 5 días, a los 10 días y a los 15 días por triplicado. Todos los efectos microbiocidas se compararon con el tratamiento sólo con natamicina y el tratamiento sólo con arginato láurico .

El primer gráfico (figura 1) muestra el poder inhibitorio del tratamiento por separado con natamicina y arginato láurico; el mejor tratamiento es el arginato láurico al 10%.

El segundo gráfico (figura 2) muestra los efectos sinérgicos entre el arginato láurico y la natamicina; la mezcla de LAE al 5% y la natamicina a 500 ppm es mejor que el arginato láurico al 10%.

El tercer gráfico (figura 3) muestra también los efectos sinérgicos entre el arginato láurico y la natamicina; la mezcla de arginato láurico al 0,5% y la natamicina a 500 ppm es parecida a los efectos de la natamicina a 1.000 ppm.

#### CONCLUSIÓN

Tras analizar los datos recogidos al finalizar el estudio, se concluyó que el tratamiento con arginato láurico al 10% es eficaz contra los microorganismos naturales que se desarrollan en el queso, pero que la mezcla de arginato láurico al 5% y natamicina a 500 ppm es la mejor, con una menor concentración de arginato láurico. Así pues la sinergia está clara.

#### Ejemplo 11

En este ejemplo se investigó la influencia de la sinergia de las combinaciones del LAE y la natamicina en la composición de la invención.

A este fin se prepararon soluciones de propilenglicol con diferentes concentraciones de LAE y natamicina.

El LAE fue elaborado por LAMIRSA, Terrassa; la natamicina se compró a SIGMA.

Los efectos de estas preparaciones se investigaron sobre los mohos *Aspergillus niger*, *Penicillium caseicolum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Rhizopus*, las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) y las levaduras *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

En las tablas 1 a 10 de más adelante se muestra el efecto del LAE y la natamicina cuando se administran por separado y combinados. La tabla indica los valores de CMI hallados a diferentes relaciones entre la natamicina y el LAE, donde un valor para natamicina : LAE 1:1 significa la misma concentración para ambas sustancias en la composición antimicrobiana.

La interacción de los dos componentes de la mezcla antimicrobiana se calcula según el método descrito por Kull et al. (Kull, F.C., Eisman, P.C., Sylwestrowicz, H.D. y Mayer, R.L., *Applied Microbiology*, 1961; 6: 538-541). Según este método, el llamado índice de sinergia se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de sinergia IS} = Q_{\text{lae}}/Q_{\text{LAE}} + Q_n/Q_n.$$

Los elementos usados para el cálculo del índice de sinergia según la anterior fórmula tienen el siguiente significado:

- 5  $Q_{lae}$  = mínima concentración de inhibición del LAE en la mezcla de LAE y natamicina.
- $Q_{LAE}$  = mínima concentración de inhibición del LAE como único antimicrobiano sin la natamicina.
- $Q_n$  = mínima concentración de inhibición de la natamicina en la mezcla del LAE y la natamicina.
- $Q_N$  = mínima concentración de inhibición de la natamicina como único antimicrobiano sin el LAE.

10 Todos los símbolos que aparecen indican una concentración específica que conduce a un punto final concreto, en este caso la inhibición del desarrollo de los microorganismos, de forma que el punto final seleccionado es de hecho la concentración inhibitoria mínima (CMI).

15 El método de Kull et al. para el cálculo del índice de sinergia permite una evaluación muy rápida del tipo de interacción manifestado por los dos componentes de la mezcla antimicrobiana. Cuando el índice de sinergia muestra un valor de más de 1, se da entonces un antagonismo entre los dos componentes. Cuando el valor de sinergia es 1, se da entonces una suma de los efectos de los dos componentes. Cuando el índice de sinergia muestra un valor de menos de 1, se da entonces una sinergia entre los dos componentes.

20 Valores de sinergia de la solución de LAE y natamicina

Terminología:

- 25  $Q_n$ : CMI de la natamicina en la mezcla de natamicina y LAE
- $Q_N$ : CMI de la natamicina sola
- $Q_{lae}$ : CMI del LAE en la mezcla de natamicina y LAE
- $Q_{LAE}$ : CMI del LAE solo
- IS: Índice de sinergia

30 Los valores de la CMI de la natamicina sola ( $Q_N$ ) que aparecen en las tablas 5 a 8 corresponden al valor máximo estudiado. No obstante, la CMI real de la natamicina es más alta que los valores máximos estudiados (esto es, 1.024 y 2.048), por consiguiente el IS real debería ser menor que el IS que aparece en las tablas.

Tabla 1.

35 *Aspergillus niger*

Relación Natamicina :LAE	$Q_n$	$Q_{lae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{lae}/Q_{LAE}$	IS
1:1	1	1	2	0,5	128	0,0078	0,508
1:5	1	5	2	0,5	128	0,0391	0,539
1:10	1	10	2	0,5	128	0,0781	0,578
1:100	0,5	50	2	0,25	128	0,3906	0,641
1:500	0,1	50	2	0,05	128	0,3906	0,441

Tabla 2.

40 *Penicillium caseicolum*

Relación Natamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{lae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{lae}/Q_{LAE}$	IS
1:1	0,5	0,5	1	0,5	256	0,0020	0,502
1:5	0,5	2,5	1	0,5	256	0,0098	0,510

ES 2 551 681 T3

1:10	0,5	5	1	0,5	256	0,0195	0,520
1:100	0,5	50	1	0,5	256	0,1953	0,695
1:500	0,25	125	1	0,25	256	0,4883	0,738

Tabla 3.

5 *Cladosporium cladosporioides*

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	0,5	0,5	1	0,5	64	0,0078	0,508
1:5	0,5	2,5	1	0,5	64	0,0391	0,539
1:10	0,5	2,5	1	0,5	64	0,0391	0,539
1:100	0,25	25	1	0,25	64	0,3906	0,641
1:500	0,1	50	1	0,1	64	0,7813	0,881

Tabla 4.

10

*Rhizopus*

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	3	3	4	0,75	648	0,0046	0,755
1:5	3	12	4	0,75	648	0,0185	0,769
1:10	3	30	4	0,75	648	0,0463	0,796
1:100	2	200	4	0,50	648	0,3086	0,809
1:500	0,5	250	4	0,13	648	0,3858	0,511

Tabla 5.

15 *Escherichia coli* ATCC 8739

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	22	22	1024	2,15E-02	32	0,6875	0,709
1:5	5	25	1024	4,88E-03	32	0,7813	0,786
1:10	2	20	1024	1,95E-03	32	0,6250	0,627
1:100	0,25	25	1024	2,44E-04	32	0,7813	0,781
1:500	0,05	25	1024	4,88E-05	32	0,7813	0,781

Tabla 6.

20 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	21	21	2048	1,03E-02	32	0,6563	0,667
1:5	5	25	2048	2,44E-03	32	0,7813	0,784
1:10	2	20	2048	9,77E-04	32	0,6250	0,626
1:100	0,25	25	2048	1,22E-04	32	0,7813	0,781
1:500	0,05	25	2048	2,44E-05	32	0,7813	0,781

Tabla 7.

25 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	20	20	1024	1,95E-02	32	0,6250	0,645
1:5	5	25	1024	4,88E-03	32	0,7813	0,786
1:10	2	20	1024	1,95E-03	32	0,6250	0,627
1:100	0,25	25	1024	2,44E-04	32	0,7813	0,781
1:500	0,05	25	1024	4,88E-05	32	0,7813	0,781

Tabla 8.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

5

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	10	10	2048	4,88E-03	16	0,6250	0,630
1:5	2	10	2048	9,77E-04	16	0,6250	0,626
1:10	1	10	2048	4,88E-04	16	0,6250	0,625
1:100	0,1	10	2048	4,88E-05	16	0,6250	0,625
1:500	0,02	10	2048	9,77E-06	16	0,6250	0,625

Tabla 9.

*Candida albicans* ATCC 10231

10

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	1	1	2	5,00E-01	16	0,0625	0,563
1:5	0,7	3,5	2	3,50E-01	16	0,2188	0,569
1:10	0,5	5	2	2,50E-01	16	0,3125	0,563
1:100	0,1	10	2	5,00E-02	16	0,6250	0,675
1:500	0,02	10	2	1,00E-02	16	0,6250	0,635

Tabla 10.

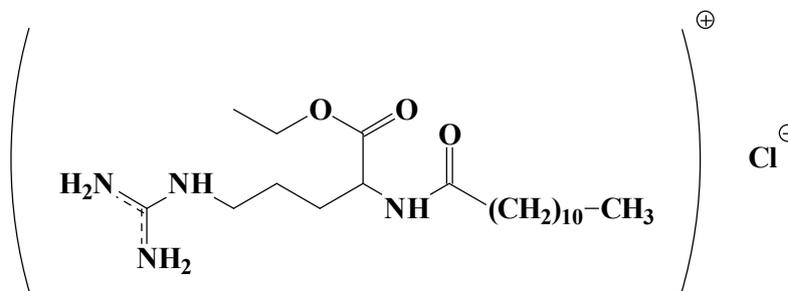
*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

15

Relación Natamicina:LAE	Q <sub>n</sub>	Q <sub>lae</sub>	Q <sub>N</sub>	Q <sub>n</sub> /Q <sub>N</sub>	Q <sub>LAE</sub>	Q <sub>lae</sub> /Q <sub>LAE</sub>	IS
1:1	2	2	2,5	8,00E-01	32	0,0625	0,863
1:5	1,5	7,5	2,5	6,00E-01	32	0,2344	0,834
1:10	1	10	2,5	4,00E-01	32	0,3125	0,713
1:100	0,25	25	2,5	1,00E-01	32	0,7813	0,881
1:500	0,05	25	2,5	2,00E-02	32	0,7813	0,801

## REIVINDICACIONES

1. Composición sólida que consiste en natamicina y un tensoactivo catiónico (LAE) de la fórmula



5

(2)

la composición sólida consistiendo en de 2-99,9% en peso de LAE y de 0,1-98% en peso de natamicina, siendo la suma de un 100%.

10

2. La composición sólida según la reivindicación 1, que comprende además componentes tales como azúcar, sal, antiapelmazantes, antioxidantes, agentes quelantes o agentes espesantes en una cantidad de 0-5 partes en peso por cada 100 partes en peso de LAE y natamicina.
3. Método para preparar una dispersión de natamicina mediante la dispersión de la composición sólida según las reivindicaciones 1 ó 2 en un disolvente.
4. El método de la reivindicación 3, donde el disolvente es agua corriente o un disolvente orgánico tal como propilenglicol o glicerina, u otro disolvente de grado alimentario, o una combinación de dichos disolventes.
5. Una dispersión de natamicina preparada según el método de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la concentración de natamicina está comprendida entre 100 ppm y 10.000 ppm, y contiene opcionalmente otros componentes tales como azúcar, sal, antiapelmazantes, antioxidantes, agentes quelantes, tensoactivos o agentes espesantes.
6. Método para preparar una solución acuosa de natamicina diluyendo la dispersión de la reivindicación 5 con agua.
7. Método para preparar una solución acuosa de natamicina diluyendo la composición sólida de las reivindicaciones 1 ó 2 en agua.
8. Solución acuosa obtenible mediante el método de las reivindicaciones 6 ó 7, que contiene natamicina en una concentración de 10 a 10.000 ppm en combinación con LAE en una concentración de 200 a 100.000 ppm y que comprende opcionalmente otros componentes tales como como azúcar, sal, antiapelmazantes, antioxidantes, agentes quelantes, tensoactivos o agentes espesantes.

25

30

35

## ES 2 551 681 T3

9. La solución acuosa según la reivindicación 8, donde la relación en peso entre natamicina y LAE es de 1:20 a 1:200.
- 5 10. La solución acuosa según las reivindicaciones 8 ó 9, donde la relación en peso preferida entre natamicina y LAE es de 1:50 a 1:100.
11. La solución acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la concentración de natamicina es de un 0,001 a un 0,15 % (peso/peso).
- 10 12. Uso de la solución acuosa de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para el tratamiento de productos alimentarios.
13. El uso según la reivindicación 12 para el tratamiento de queso, fiambres y productos de panadería.
- 15 14. El uso según la reivindicación 12 para el tratamiento de preparados líquidos tales como bebidas.
15. El uso de las preparaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 y 8 a 11 para el tratamiento de preparados de cosmética.
- 20 16. El uso de las preparaciones según las reivindicaciones 1, 2, 5 y 8 a 11 para la preparación de medicamentos para tratar infecciones en animales o seres humanos.

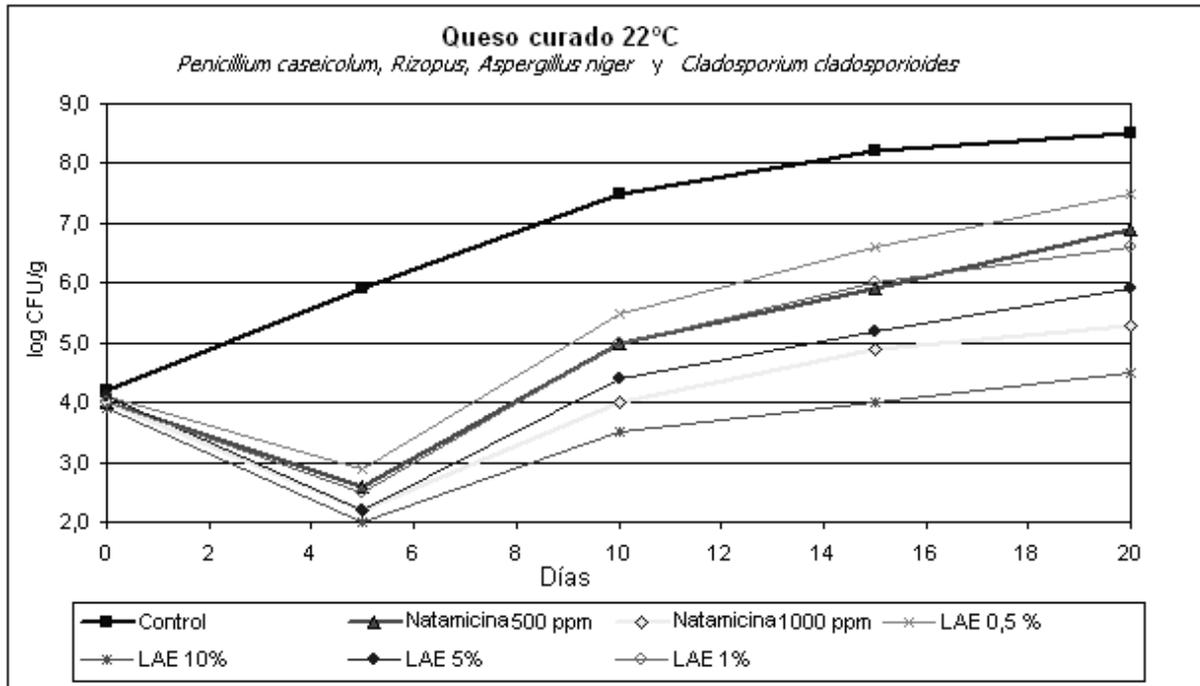


Figura 1

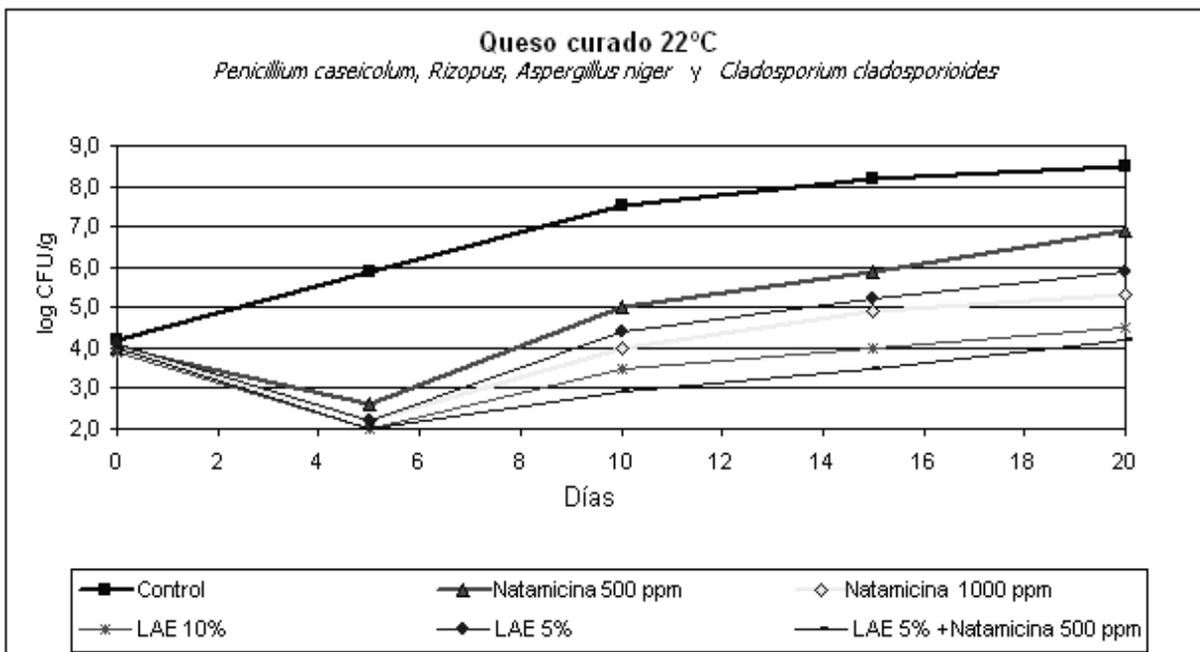
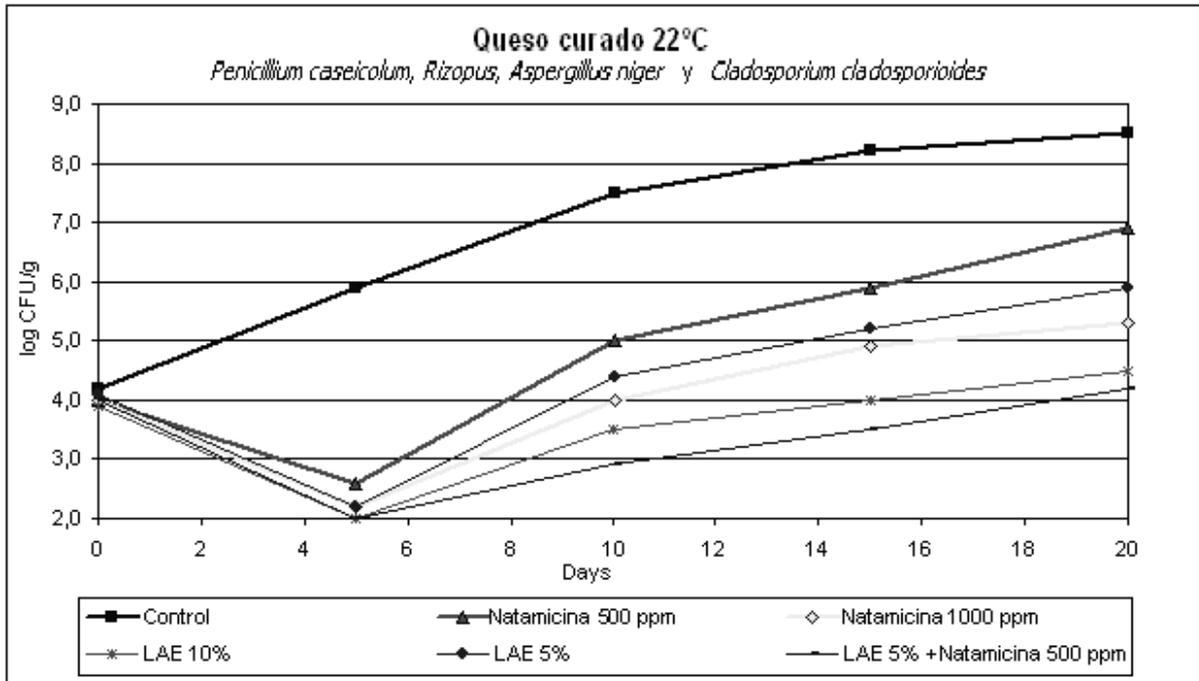


Figura 2



**Figura 3**