

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 526**

51 Int. Cl.:

**D21H 21/36** (2006.01)

**D21H 17/09** (2006.01)

**D21H 17/07** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2017** **E 17188321 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 3450626**

54 Título: **Método para controlar el crecimiento de microorganismos y/o biopelículas en un proceso industrial**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.12.2020**

73 Titular/es:

**KEMIRA OYJ (50.0%)**  
**Energiakatu 4**  
**00180 Helsinki, FI y**  
**UNIVERSITY OF COPENHAGEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SIMELL, JAAKKO;**  
**KOLARI, MARKO;**  
**GIVSKOV, MICHAEL;**  
**TOLKER-NIELSEN, TIM;**  
**RYBTKE, MORTEN LEVIN y**  
**ANDERSEN, JENS BO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 799 526 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**

Método para controlar el crecimiento de microorganismos y/o biopelículas en un proceso industrial

La presente invención se refiere a un método para controlar el crecimiento de microorganismos y/o biopelículas en un proceso industrial de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación independiente adjunta.

5 Los microorganismos están presentes en la mayoría de los procesos industriales. Su presencia es especialmente engorrosa en procesos que requieren mucha agua, tales como la fabricación de pasta de papel, papel, cartón o similares. Los microorganismos prosperan cuando el agua del proceso contiene sustancias biodegradables disueltas y la temperatura y el pH del agua del proceso son favorables para la vida microbiana. Los microorganismos pueden entrar en el proceso por contaminación desde el aire, agua cruda entrante y/o materias primas no estériles. Si no se toman contramedidas, los microorganismos pueden causar grandes problemas en un proceso, tal como la fabricación de papel. Los problemas relacionados con los microorganismos incluyen, por ejemplo, descomposición de aditivos químicos, cambio perjudicial en el pH del proceso, formación de compuestos malolientes o tóxicos, y/o formación de biopelículas en las superficies.

10 En la fabricación de papel y cartón, los problemas pueden dar lugar a defectos, tales como manchas y agujeros, en la banda conformada, o incluso a roturas de la banda y paradas de la máquina, por ejemplo, cuando las gotas de limo se están desprendiendo. En una fábrica de pasta de papel, papel o cartón, el crecimiento microbiano incontrolado podría por tanto causar problemas y existe la necesidad de un tratamiento efectivo de control microbiano. Sin embargo, solo un número limitado de agentes antimicrobianos demuestra un buen rendimiento biocida en las condiciones del proceso que prevalecen en la fabricación de papel o cartón, p. ej., un alto contenido de material de fibra celulósica, alta temperatura, altos caudales y alta demanda de oxidantes. Además, en estos procesos, los microorganismos, principalmente bacterias, están continuamente presentes y pueden introducirse en la mitad del proceso continuo. Debido a las condiciones del proceso, los biocidas convencionales, que se utilizan en la industria de la pasta de papel, papel y cartón, son diferentes de los agentes antimicrobianos comunes utilizados en otras industrias, p. ej., la industria alimentaria o en agricultura. Por ejemplo, en la industria alimentaria, el entorno se esteriliza al principio, después de lo cual la producción continúa en condiciones estériles y con materias primas estériles. Estas condiciones son muy diferentes de las condiciones no estériles que prevalecen en un proceso abierto de producción de papel o cartón. Especialmente importante en los procesos que comprenden material de fibra celulósica, tales como la fabricación de pasta de papel, papel y cartón, es el control efectivo de la biopelícula en las superficies del proceso. La formación de biopelículas sigue siendo un problema frecuente en la fabricación de papel y cartón, a pesar del uso regular de biocidas comunes en los flujos de recirculación de agua. Existe la necesidad de mejorar la eficacia del control de biopelículas en las condiciones de los procesos de fabricación de pasta de papel, papel y cartón.

15 El documento WO2013/045638 describe un sistema biocida que comprende iones de zinc y un biocida, que forman in situ una composición biocida, en la que el biocida se selecciona de un biocida oxidante o un biocida no oxidante.

20 Un objeto de esta invención es minimizar o posiblemente incluso eliminar las desventajas existentes en la técnica anterior.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método que permita controlar eficazmente las biopelículas con una dosis baja en un proceso de fabricación industrial que comprende material de fibra celulósica, por ejemplo, en la fabricación de pasta de papel, papel o cartón.

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método que permita impedir, inhibir y/o reducir eficazmente el crecimiento de biopelículas con una dosis baja en un proceso de fabricación industrial que comprende material de fibra celulósica, por ejemplo, en la fabricación de pasta de papel, papel o cartón.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método que permita controlar eficazmente el crecimiento de microorganismos en un proceso de fabricación industrial que comprenda material de fibra celulósica, por ejemplo, en la fabricación de pasta de papel, papel o cartón.

30 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método simple y eficaz para el control de biopelículas industriales a altas temperaturas, especialmente en condiciones de proceso acuosas con alto contenido de fibra celulósica y/o al menos fuerzas de cizallamiento localmente altas y/o caudales elevados.

Estos objetos se alcanzan con la invención que tiene las características presentadas a continuación en las partes que caracterizan las reivindicaciones independientes.

35 Algunas realizaciones preferidas de la invención se presentan en las reivindicaciones dependientes.

Las realizaciones mencionadas en este texto se refieren, cuando corresponde, a todos los aspectos de la invención, incluso si esto no siempre se menciona por separado.

En un método típico de acuerdo con la presente invención para controlar la biopelícula y/o para eliminar una biopelícula formada y/o para controlar el crecimiento de microorganismos, preferiblemente bacterias, en un medio acuoso de un

proceso de fabricación industrial que comprende material de fibra celulósica, administrando al medio acuoso del proceso, una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3-[(4-metilfenil)sulfonil]-2-propenonitrilo y 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida.

5 Ahora se ha encontrado que los compuestos seleccionados entre 3-[(4-metilfenil)-sulfonil]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida son altamente efectivos para controlar la formación de biopelículas y/o el crecimiento de microorganismos, en un medio acuoso de un proceso de fabricación industrial que comprende material de fibra celulósica, especialmente en la fabricación de papel, cartón y pasta de papel. El efecto obtenido es bueno incluso a dosis bajas del compuesto y en medios acuosos que tienen un alto caudal y/o alta temperatura. Era inesperado que los compuestos mostraran un rendimiento antimicrobiano tan bueno o incluso mejor que los agentes antimicrobianos convencionales utilizados contra las biopelículas en la industria de la pasta de papel y el papel. Las composiciones de la invención son útiles para proporcionar un efecto antibacteriano y controlar el crecimiento de biopelículas y/o bacterias.

15 En el presente contexto de la expresión "control del crecimiento de biopelículas" abarca acciones de control seleccionadas al menos de impedir, inhibir y/o reducir la biopelícula. Estas acciones de control pueden tener lugar antes, durante o después de la formación de la biopelícula y las acciones de control pueden tener lugar por separado o simultáneamente, por ejemplo, las composiciones que comprenden dichos compuestos pueden tanto impedir la formación de una nueva biopelícula como reducir simultáneamente la biopelícula existente. Los compuestos pueden ser útiles para impedir la formación de la biopelícula. Esto significa que los compuestos evitan la formación de biopelículas en superficies de proceso libres de biopelículas. Los compuestos también pueden ser útiles para inhibir la biopelícula. Esto significa que los compuestos inhiben el crecimiento adicional de la biopelícula existente y/o inhiben la formación de la biopelícula en una superficie de proceso libre de biopelícula. Los compuestos pueden ser además útiles para reducir la biopelícula. Esto significa que los compuestos reducen la cantidad de biopelícula existente en las superficies del proceso. En general, el control del crecimiento de biopelículas puede lograrse controlando la cantidad de microorganismos en el proceso y/o controlando su crecimiento en modo de biopelículas. La composición que comprende dichos compuestos puede ser útil para controlar el crecimiento de microorganismos, en forma de biopelícula y/o en forma libre en el medio acuoso de un proceso de fabricación industrial que comprende material de fibra celulósica, preferiblemente en forma de biopelícula.

20 En el presente contexto, el término "biopelícula" se entiende como una comunidad de microorganismos, típicamente bacterias, que se adhiere a una superficie de proceso y generalmente crece rodeada por una matriz compleja de sustancias extrapoliméricas. La biopelícula protege a los microorganismos, lo que hace que el control del crecimiento de la biopelícula sea un reto mayor que el control del crecimiento de microorganismos libres. El control ineficaz de la biopelícula puede causar problemas importantes en los procesos industriales, por ejemplo, en forma de una mayor necesidad de limpieza, paradas de producción y/o deterioro de la calidad y/o cantidad de la producción.

25 En el presente contexto, la expresión "control del crecimiento de los microorganismos" se refiere a la eliminación y/o reducción de la cantidad y/o actividad de los microorganismos y la expresión es sinónimo de cualquier efecto bioestático o biocida, como matar, impedir, eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Los microorganismos pueden estar presentes en forma libre en el medio acuoso o en forma de una biopelícula, también conocida como modo de crecimiento en biopelícula

30 En el presente contexto, la expresión "medio acuoso" se refiere a un sistema de agua industrial que contiene una solución acuosa. La presente invención se refiere especialmente a procesos industriales que tienen un medio acuoso que comprende material de fibra celulósica de origen natural. De acuerdo con una realización de la invención, la temperatura del medio acuoso es de al menos 40°C, preferiblemente de al menos 50°C.

35 Especialmente, la composición de la presente invención es adecuada para administrar o usar en procesos de fabricación industrial que comprenden material de fibra celulósica, tales como la fabricación de papel, cartón, pasta de papel, tejidos, pasta de papel moldeada, materiales no tejidos, viscosa o similares. El medio acuoso comprende preferiblemente al menos agua, material de fibra celulósica, fragmentos finos y/o de fibra de origen natural. El medio acuoso también puede comprender almidón. El material de fibra celulósica se origina preferiblemente de fuentes de madera blanda, madera dura o diferentes de la madera, tales como bambú o kenaf, o cualquier mezcla de los mismos. Preferiblemente, el material de fibra celulósica se origina a partir de material de fibra lignocelulósica. Más preferiblemente, el material de fibra celulósica es fibras lignocelulósicas. El material de fibra celulósica puede originarse a partir de cualquier proceso mecánico, quimiomecánico o químico adecuado de formación de pasta de papel o cualquiera de sus combinaciones o cualquier otro proceso de formación de pasta de papel adecuado conocido como tal. El material de fibra celulósica también puede comprender material de fibra que se origina a partir de cartón, papel o pasta de papel reciclados. Por ejemplo, el material de fibra celulósica puede comprender fibras celulósicas que se originan de madera dura y tienen una longitud de 0,5-1,5 mm y/o de madera blanda y tienen una longitud de 2,5-7,5 mm. El medio acuoso también puede comprender partículas minerales inorgánicas, tales como cargas y/o minerales de recubrimiento; hemicelulosas; lignina; y/o sustancias disueltas y coloidales. El medio acuoso también puede comprender aditivos para la fabricación de papel, tales como almidón, agentes de encolado, agentes de coagulación o floculación inorgánicos u orgánicos, polímeros naturales o sintéticos de diferente longitud y/o carga, colorantes, abrillantadores ópticos o cualquier combinación de los mismos.

La composición puede comprender el compuesto 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo en forma de un isómero Z o E, o la composición puede comprender una mezcla de ambos isómeros. Por ejemplo, la relación de isómeros E a Z en la composición puede ser de 70:30 a 100:0 o de 80:20 a 99:1. Alternativamente, la relación de isómeros E a Z en la composición puede ser de 30:70 a 0:100 o de 20:80 a 1:99.

5 De acuerdo con una realización de la invención, es posible administrar a los procesos de fabricación industrial que comprenden material de fibra celulósica una composición que comprende uno o ambos de los compuestos seleccionados entre 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo y 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida. En caso de que ambos compuestos se administren al medio acuoso, se pueden administrar como una composición, es decir, una mezcla, o se pueden administrar como dos composiciones diferentes sucesivamente una tras otra. En caso de que se administren ambos compuestos, las dosificaciones individuales para ambos compuestos pueden ser iguales o diferentes entre sí. De esta manera, es posible controlar eficazmente la biopelícula y/o los microorganismos en el medio acuoso.

15 La presente invención es adecuada para controlar el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, pertenecientes al género de *Meiothermus*, *Deinococcus* y/o *Pseudoxanthomonas* en el medio acuoso. De acuerdo con una realización de la invención, el medio acuoso del proceso de fabricación industrial que comprende material de fibra celulósica comprende, por lo tanto, bacterias que pertenecen al género de *Meiothermus*, *Deinococcus* y/o *Pseudoxanthomonas*, solas o en cualquier combinación, o el medio acuoso está en contacto con una biopelícula al menos parcialmente formada por cualquiera de dichas bacterias. Los microorganismos en dichos procesos industriales típicamente no son microorganismos fotosintéticos, es decir, preferiblemente el medio acuoso está casi o completamente libre de microorganismos fotosintéticos, p. ej., algas. La adición del compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida reduce la cantidad de dichos microorganismos, ya sea en forma libre o como biopelícula, o incluso elimina por completo su presencia en el medio acuoso. La eliminación puede ser total o parcial. En el presente documento, la prevención se refiere a cualquier acción preventiva de eliminación que reduzca o inhiba el crecimiento de los microorganismos en modo de biopelícula y, de este modo, evite total o parcialmente la formación de la biopelícula.

20 En general, la composición que comprende el compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida se puede agregar al medio acuoso en cantidades bioestáticas o biocidas. La cantidad bioestática se refiere a una cantidad suficiente para al menos impedir y/o inhibir la actividad y/o el crecimiento de los microorganismos o de la biopelícula. La cantidad biocida se refiere a una actividad más efectiva, tal como una cantidad capaz de reducir la actividad y/o el crecimiento de los microorganismos o de la biopelícula y/o matar la mayoría o la totalidad de los microorganismos presentes en el medio acuoso. De acuerdo con una realización de la invención, el compuesto se puede agregar al medio acuoso en una cantidad de dosificación de 0,01-100 ppm, preferiblemente 0,01-10 ppm, más preferiblemente 0,01-2 ppm o 0,01-1 ppm, incluso más preferiblemente 0,01-0,5 ppm o 0,01-0,3 ppm, calculada como ingrediente activo, es decir, 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo y/o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida. La efectividad del compuesto permite el uso de dosis y concentraciones bajas mientras se mantiene un buen control del crecimiento de microorganismos y de la formación y/o crecimiento de biopelículas.

30 Las composiciones que comprenden compuestos seleccionados de 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida se pueden agregar al medio acuoso como un sólido, tal como polvo seco, o más preferiblemente en forma líquida. Los compuestos pueden dosificarse continua o periódicamente. Según una realización de la invención, los compuestos pueden administrarse periódicamente al medio acuoso durante 3-45 minutos durante 6-24 veces al día, preferiblemente durante 10-30 minutos durante 12-24 veces al día.

45 Según una realización de la invención, el proceso de fabricación industrial que tiene un medio acuoso que comprende material de fibra celulósica de origen natural es un proceso de fabricación de pasta de papel y/o papel y/o cartón, donde el medio acuoso muestra alta temperatura y/o alta velocidad de flujo. El compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida se agrega o dosifica a un sistema de fabricación de pasta de papel y/o papel y/o cartón. Los medios acuosos en estos procesos a menudo muestran un alto flujo y altas velocidades de cizallamiento, lo que puede inducir la formación de biopelículas en las superficies del proceso debido al estrés de los microorganismos. Por ejemplo, en entornos de fabricación de papel y cartón, los caudales pueden ser superiores a 1 m/s, incluso superiores a 10 m/s, normalmente de 1 a 20 m/s o de 1 a 10 m/s. Se ha observado que las composiciones que comprenden dichos compuestos son efectivas especialmente en estas condiciones exigentes, y generalmente se pueden usar durante todo el proceso para reducir y/o impedir el crecimiento de microorganismos y la formación de una biopelícula sobre las superficies del proceso. En principio, las composiciones que comprenden dichos compuestos se pueden agregar en casi cualquier punto del proceso, especialmente en el proceso con agua de proceso recirculada para mantener el control de microorganismos y/o la formación de biopelículas durante todo el proceso. Las composiciones que comprenden dichos compuestos también pueden añadirse o alternativamente al material de fibra celulósica, p. ej., material de fibra lignocelulósica, que se utiliza como materia prima en el proceso.

60 El proceso de fabricación industrial que tiene un medio acuoso que comprende material de fibra celulósica de origen natural puede ser un proceso de fabricación de pasta de papel y/o papel y/o cartón, donde el pH del medio acuoso está en el intervalo 5-9, preferiblemente 7-8,5.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, el compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)sulfonil]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida puede agregarse en el proceso de fabricación industrial que tiene un medio acuoso que comprende material de fibra celulósica, que es el proceso de fabricación de papel y/o cartón, especialmente en un circuito corto del proceso de fabricación de papel o cartón. En un proceso típico de fabricación de papel y cartón, la pasta papelera se pasa a una caja de entrada, que distribuye la pasta papelera sobre un alambre en movimiento en una sección de formación, sobre la cual se forma la banda continua de papel. En el presente documento, la sección de circuito o circulación cortos de una máquina de papel/cartón se entiende, como es habitual en la técnica, como la parte del sistema de fabricación que recicla y recicla al menos una parte del exceso de agua de la pasta papelera, recolectada en un silo en la sección de formación, retornada a la caja de entrada para su reutilización.

Alternativamente, o además, el compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)-sulfonil]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida se puede agregar en el proceso de fabricación industrial que tiene un medio acuoso que comprende material de fibra celulósica, p. ej., un proceso de fabricación de pasta de papel y/o papel y/o cartón, para procesar torres de almacenamiento de agua, tales como torres de agua circulante y torres de agua filtrada; para clarificar o enturbiar los depósitos de almacenamiento de filtrado; depósitos de formación de pasta papelera; corrientes acuosas aguas arriba/aguas abajo de los depósitos de formación de la pasta papelera; sistema de papel deteriorado y corrientes de proceso acuosas aguas arriba/aguas abajo de los recipientes en el mismo; las corrientes del proceso del silo aguas arriba/aguas abajo del silo; corrientes de proceso de la caja de mezcla de la máquina de papel aguas arriba/aguas abajo de la caja; depósito de agua dulce; depósito de agua caliente y/o depósito de agua de ducha.

Alternativamente, o, además, el compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)sulfonil]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida se puede agregar en el proceso de fabricación industrial que tiene un medio acuoso que comprende material de fibra celulósica, que es el proceso de fabricación de papel y/o cartón, en cualquier ubicación en un circuito largo del proceso de fabricación de papel o cartón. La sección de circuito o circulación largos de una máquina de papel/cartón se entiende en este documento, como es habitual en la técnica, la parte del sistema de fabricación que maneja el exceso de agua y el papel deteriorado. La mayor parte del agua recuperada sale del circuito corto y se bombea al circuito largo, que incluye: guardar todo para capturar fibras útiles del agua recuperada para su reutilización, depósitos de almacenamiento para el agua filtrada utilizada, por ejemplo, en duchas de máquinas y depósitos de almacenamiento para agua recirculada utilizada, por ejemplo, como agua de dilución para importar pasta de papel desde la fábrica de pasta de papel a la máquina de papel/cartón. Una parte del circuito largo es el sistema de papel deteriorado para manejar los rechazos de papel húmedo y seco de la máquina. Este material es repulpado y reutilizado como parte de la pasta papelera.

De acuerdo con una realización, el compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)-sulfonil]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida se agrega al medio acuoso, que comprende un residuo de peróxido de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 ppm o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 ppm.

De acuerdo con una realización de la invención, el compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)sulfonil]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida puede usarse en combinación con otros agentes biocidas o antimicrobianos. Otros agentes biocidas o antimicrobianos adecuados pueden ser agentes biocidas o antimicrobianos no oxidantes, o agentes biocidas o antimicrobianos oxidantes. Los agentes biocidas o antimicrobianos no oxidantes adecuados son, por ejemplo, glutaraldehído, 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA), 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol), compuestos de amonio cuaternario, carbamatos, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CMIT) y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (MIT). Los agentes biocidas o antimicrobianos oxidantes adecuados son, por ejemplo, cloro, sales de hipoclorito, ácido hipocloroso, isocianuratos clorados, bromo, sales de hipobromito, ácido hipobromoso, cloruro de bromo, dióxido de cloro, ozono, peróxido de hidrógeno y peroxi compuestos, tales como ácido peracético o ácido perfórmico. Otros agentes biocidas oxidantes adecuados son, por ejemplo, compuestos halógenos estabilizados en los que el halógeno activo, tal como el cloro o el bromo, se hace reaccionar con un compuesto nitrogenado, tal como dimetilhidantoina, una sal de amonio, urea, carbamato u otra molécula que contenga nitrógeno capaz de reaccionar con un halógeno activo. Por ejemplo, en una realización, el compuesto seleccionado entre 3-[(4-metilfenil)sulfonil]-2-propenonitrilo o 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida se agrega al medio acuoso, que comprende un residuo de halógeno activo en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 ppm, dado como cloro activo.

### Parte experimental

Algunas realizaciones de la invención se describen más detalladamente en los siguientes ejemplos no limitantes.

### Materiales y métodos utilizados en los ejemplos

Para estudiar la eficacia de varios productos químicos para impedir la formación de biopelículas se utilizaron cultivos puros de *Meiothermus silvanus*, una especie de microbio que se encuentra comúnmente en las biopelículas de máquinas de papel (Ekman J, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 34:203-211) y *Pseudoxanthomonas taiwanensis*, otra especie comúnmente encontrada en entornos de máquinas de papel (Desjardins, E y Beaulieu, C, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 30:141-145).

5 Los ensayos de formación de biopelículas se realizaron en caldo comercial sintético R2 (Lab M Ltd, Reino Unido) o en agua sintética con fibras de máquina de papel, SPW (preparada de acuerdo con Peltola, et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2011, 38:1719-1727) utilizando pocillos de placas de 96 micropocillos con tapas con clavijas (Thermo Fischer Scientific Inc., EE. UU.). Las placas se incubaron a 45°C con agitación giratoria (150 rpm) proporcionando un alto flujo en cada pocillo.

El 3-[(4-metilfenil)sulfonyl]-2-propenonitrilo, en lo sucesivo denominado Compuesto A, se obtuvo de EMD Biosciences Inc, Estados Unidos; pureza  $\geq 98\%$  de isómero E

La 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida, en lo sucesivo denominada Compuesto B, se obtuvo de Sigma Aldrich Finland Oy.

10 La 2,2-dibromo-3-nitropropionamida, en lo sucesivo denominada DBNPA, se obtuvo de Kemira Oyj (Fennosan R20, ingrediente activo al 20%).

#### Método de ensayo para impedir la formación de biopelículas

15 Para los experimentos de impedimento de la formación de biopelículas, se llenaron pozos de placas de 96 micropocillos con tapas con clavijas con caldo R2 o SPW, se inocularon con cultivos bacterianos puros y se trataron con diferentes cantidades de compuestos químicos a ensayar. Se puso la tapa con clavijas. Después de 24 horas, los pocillos se vaciaron y se añadió a los pocillos una solución nueva de cultivo puro que contenía SPW o caldo R2 con diferentes cantidades de productos químicos a ensayar y la tapa con clavijas original se volvió a colocar en su lugar. Después de 24 horas adicionales, es decir, 48 horas después de comenzar el ensayo, los pocillos se vaciaron, se enjuagaron y la tapa con clavijas y los pocillos se dejaron secar.

#### 20 Método de ensayo para la eliminación de la biopelícula existente

Para los experimentos de eliminación de la biopelícula ya existente (preformada) se llenaron placas de 96 micropocillos con tapas con clavijas con SPW, inoculada con cultivos bacterianos puros. La biopelícula se cultivó durante 24 horas sin la adición de ningún compuesto químico a ensayar. En algunos experimentos, el procedimiento se repitió después de 24 horas vaciando los pocillos y mediante la adición de una solución nueva de SPW inoculada con cultivo bacteriano puro, nuevamente sin ningún compuesto químico de ensayo. La tapa con clavijas original se volvió a colocar en su lugar y se permitió que la biopelícula creciera durante 24 h adicionales, es decir, en total 48 h.

25 Después de 24 o 48 horas de comenzar el ensayo, se vaciaron los pocillos y se añadió una solución nueva de SPW, inoculada con cultivos bacterianos puros y con diferentes cantidades de compuestos químicos a ensayar y se volvió a colocar la tapa con clavijas original en su lugar. Después de 2 o 24 horas adicionales, los pocillos se vaciaron, se enjuagaron y la tapa con clavijas y los pocillos se dejaron secar.

#### 30 Cuantificación de la biopelícula formada

La cantidad de biopelícula formada en los micropocillos y las superficies de las clavijas se cuantificó con una solución de tinción agregando a cada pocillo 200  $\mu\text{L}$  de Cristal Violeta al 1% en metanol (Merck Millipore KGaA, Alemania) y volviendo a colocar la tapa con clavijas. Después de 3 minutos, los pocillos se vaciaron y los pocillos y las clavijas se enjuagaron 3 veces con agua corriente. El Cristal Violeta unido se disolvió en etanol y se midió la absorbancia a 595 nm. Los valores mostrados en las siguientes tablas son la absorbancia promedio de 8 pocillos y clavijas replicados.

Todos los valores de absorbancia en los Ejemplos 1-6 se dan como valores medidos reales. En el cálculo de los porcentajes de reducción de la biopelícula se tuvo en cuenta que el SPW solo durante 2 días sin ningún inóculo bacteriano dio un valor de fondo de 0,14.

#### 40 Ejemplo 1

Las Tablas 1 y 2 demuestran la capacidad del Compuesto A para impedir la formación de biopelículas de *Meiothermus silvanus* y *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. Las condiciones de ensayo simularon condiciones de proceso de fabricación de papel o cartón (agua sintética de máquina de papel, alta temperatura, fibras presentes, alto flujo) y se observó que el Compuesto A controlaba la formación de biopelículas a una concentración muy baja. Ya a una dosis de 0,13 mg/L, el Compuesto A activo dio más que 90% de efecto de reducción de las biopelículas. A modo de comparación, el agente antimicrobiano convencional DBNPA requirió una dosis de 1 mg/L de compuesto activo para alcanzar la misma eficacia de reducción de las biopelículas. Los resultados para DBNPA se dan en las Tablas 3 y 4.

La Tabla 1 muestra el efecto de la dosificación del Compuesto A en biopelículas de *Meiothermus silvanus* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Dosis dadas como ingrediente activo.

Tabla 1

Dosis del Compuesto A [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 horas de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0	0,98	-
0,01	0,80	21,4
0,03	0,75	27,4
0,08	0,58	47,6
0,13	0,22	90,5
0,20	0,15	98,8

5 La Tabla 2 muestra el efecto de la dosificación del Compuesto A en biopelículas de *Pseudoxanthomonas taiwanensis* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Dosis dadas como ingrediente activo.

Tabla 2

Dosis del Compuesto A [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0	1,48	-
0,01	1,42	4,5
0,03	1,26	16,4
0,08	0,88	44,8
0,13	0,55	69,4
0,20	0,39	81,3

10 La Tabla 3 muestra el efecto de la dosificación de DPNPA en biopelículas de *Meiothermus silvanus* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de absorbancia. Dosis dadas como ingrediente activo.

Tabla 3

Dosis de DPNPA [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0	0,66	
0,2	0,57	16,9
0,6	0,35	60,7
1	0,15	98,8

15 La Tabla 4 muestra el efecto de la dosificación de DPNPA en biopelículas de *Pseudoxanthomonas taiwanensis* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Dosis dada como ingrediente activo.

Tabla 4

Dosis de DPNPA [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula, [%]
0	1,65	
0,2	1,46	12,6
0,6	1,23	27,8
1	0,14	99,9

Los resultados en las Tablas 1 a 4 demuestran que el Compuesto A es capaz de impedir la formación de biopelículas de formadores de biopelículas industriales dominantes en condiciones de máquinas de papel a una dosis muy baja en comparación con el biocida convencional utilizado en la industria del papel.

**Ejemplo 2 (referencia)**

- 5 Las Tablas 5 y 6 muestran el efecto de un antibiótico bien conocido, la gramicidina, contra la formación de biopelículas de *Meiothermus silvanus* y *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. En un medio de crecimiento sintético, el caldo R2, la gramicidina fue capaz de impedir la formación de biopelículas a una concentración claramente menor que en condiciones que simulan el proceso de fabricación de papel o cartón (agua sintética de máquina de papel, alta temperatura, fibras presentes, alto flujo).
- 10 Los resultados en las Tablas 5 y 6 demuestran el comportamiento esperado de un compuesto antimicrobiano clínico con un rendimiento deteriorado cuando se expone a condiciones no clínicas. Por el contrario, el Compuesto A fue capaz de controlar biopelículas en agua de máquina de papel a una concentración muy baja, como se muestra en el Ejemplo 1.
- 15 La Tabla 5 muestra el efecto de la dosificación de gramicidina en biopelículas de *Meiothermus silvanus* en caldo R2 y SPW. La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Dosis dadas como ingrediente activo.

Tabla 5

Dosis gramicidina [mg/L]	de	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto en caldo R2		Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto en SPW	
		Abs a 595 nm	Reducción de biopelícula, [%]	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula, [%]
0		1,60	-	1,36	-
0,2		1,40	13,7	1,33	2,5
1		0,66	64,4	1,41	-4,1
3		0,17	97,9	0,45	74,6
10		0,14	100,0	0,19	95,9

- 20 La Tabla 6 muestra el efecto de la dosificación de gramicidina en biopelículas de *Pseudoxanthomonas taiwanensis* en caldo R2 y SPW. La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Dosis dadas como ingrediente activo.

Tabla 6

Dosis gramicidina [mg/L]	de	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto en caldo R2		Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto en SPW	
		Abs a 595 nm	Reducción de biopelícula, [%]	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula, [%]
0		2,78	-	2,37	-
3		2,80	-0,8	2,25	5,4
10		2,55	8,7	2,41	-1,8
25		0,19	98,1	2,42	-2,2

**Ejemplo 3**

- 25 Las Tablas 7 y 8 demuestran la capacidad del Compuesto B para impedir la formación de biopelículas de *Meiothermus silvanus* y *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. Las condiciones de ensayo son idénticas a las condiciones de ensayo del Ejemplo 1.

La Tabla 7 muestra el efecto de la dosificación del Compuesto B en biopelículas de *Meiothermus silvanus* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Dosis dadas como ingrediente activo.

30

Tabla 7

Dosis del Compuesto B [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0	0,88	
0,1	0,62	34,4
0,25	0,18	94,0
1	0,15	99,1
3	0,16	97,9
10	0,18	94,0

La Tabla 8 muestra el efecto de la dosificación del Compuesto B en biopelículas de *Pseudoxanthomonas taiwanensis* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Dosis dadas como ingrediente activo.

Tabla 8

Dosis del Compuesto B [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0	2,41	
0,25	2,35	2,6
1	2,04	16,3
3	0,84	69,3
10	0,54	82,4

Los resultados en las Tablas 7 y 8 demuestran que el Compuesto B puede impedir la formación de biopelículas de formadores de biopelículas industriales dominantes en condiciones de las máquinas de papel.

#### Ejemplo 4

Las Tablas 9 y 10 demuestran la capacidad del Compuesto A para eliminar la biopelícula ya formada de *Meiothermus silvanus* y *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. Condiciones de ensayo simuladas en condiciones de proceso de fabricación de papel (agua sintética de máquina de papel, alta temperatura, fibras presentes, alto flujo). Se observó que el compuesto A eliminaba las biopelículas ya formadas. Una dosis única de 0,5 mg/L de compuesto activo eliminó toda la biopelícula formada durante el tiempo de pre-crecimiento de 48 horas en 24 horas después de la adición del Compuesto A.

La Tabla 9 muestra el efecto de la dosificación del Compuesto A en biopelículas de *Pseudoxanthomonas taiwanensis* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se hizo crecer previamente durante 48 h, después de lo cual se añadió el Compuesto A en una cantidad dada. Después de 24 horas, la biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Las dosis del compuesto A se dan como compuesto activo.

Tabla 9

Dosis del Compuesto A [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 h de pre-crecimiento y 24 h de tiempo de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0	2,48	
0,2	1,73	32,2
0,5	0,13	100,2

La Tabla 10 muestra el efecto de la dosificación del Compuesto A en biopelículas de *Meiothermus silvanus* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se hizo crecer previamente durante 48 h, después de lo cual se añadió el Compuesto A en una cantidad dada. Después de 2 horas, la biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Las dosis del compuesto A se dan como compuesto activo.

Tabla 10

Dosis del Compuesto A [mg/L]	Cantidad de biopelícula después de 48 h de pre-crecimiento y 2 h de tiempo de contacto	
	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0	1,30	
0,5	1,20	8,0
1	1,11	16,3
2	0,99	26,6

### Ejemplo 5

5 Se obtuvo el compuesto A y sus isómeros E y Z se separaron entre sí. Las Tablas 11 y 12 demuestran la capacidad de los isómeros E y Z del Compuesto A para evitar la formación de biopelículas de *Meiothermus silvanus* y *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. Las condiciones de ensayo son idénticas a las condiciones de ensayo del Ejemplo 1. Se ve que ambos isómeros del Compuesto A evitan la formación de biopelículas.

10 La Tabla 11 muestra el efecto de los isómeros E y Z del Compuesto A en biopelículas de *Meiothermus silvanus* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Las dosis del compuesto A se dan como compuesto activo.

Tabla 11

Dosis Compuesto [mg/L]	del A	Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto, isómero E		Cantidad de biopelícula después de 48 h de tiempo de contacto, isómero Z	
		Abs a 595 nm	Reducción de biopelícula [%]	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0		1,52	-	1,52	-
0,1		0,40	88,9	0,16	99,1
0,2		0,16	99,3	0,15	99,4

15 La Tabla 12 muestra el efecto de los isómeros E y Z del Compuesto A en biopelículas de *Pseudoxanthomonas taiwanensis* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Las dosis del compuesto A se dan como compuesto activo.

Tabla 12

Dosis Compuesto [mg/L]	del A	Cantidad de biopelícula después de 48 horas de tiempo de contacto, isómero E		Cantidad de biopelícula después de 48 horas de tiempo de contacto, isómero Z	
		Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0		1,46	-	1,46	-
0,1		0,36	90,6	0,16	99,3
0,2		0,16	99,1	0,16	99,3

### Ejemplo 6

20 Se obtuvo el compuesto A y sus isómeros E y Z se separaron entre sí. La Tabla 13 demuestra la capacidad de los isómeros E y Z del Compuesto A para eliminar las biopelículas ya formadas de *Meiothermus silvanus* y *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. Condiciones del ensayo simuladas en condiciones de proceso de fabricación de papel (agua de sintética máquina de papel, alta temperatura, fibras presentes, alto flujo). Se ve que ambos isómeros del Compuesto A son efectivos para eliminar las biopelículas ya formadas.

25 La Tabla 13 muestra el efecto de los isómeros E y Z del Compuesto A en biopelículas de *Meiothermus silvanus* en SPW a 45°C y 150 rpm (mezclado elevado). La biopelícula se hizo crecer previamente durante 24 h después de que se añadiera el isómero E o Z del Compuesto A en la cantidad indicada. Después de 24 horas, la biopelícula se tiñó y cuantificó mediante medición de la absorbancia. Las dosis del compuesto A se dan como compuesto activo.

Tabla 13

Dosis del Compuesto [mg/L]	del A	Cantidad de biopelícula después de 24 h de pre-crecimiento y 24 h de tiempo de contacto, isómero E		Cantidad de biopelícula después de 24 h de pre-crecimiento y 24 h de tiempo de contacto, isómero Z	
		Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]	Abs a 595 nm	Reducción de la biopelícula [%]
0		1,36	-	-	-
0,2		0,90	67,6	0,81	71,3
1		0,26	95,0	0,27	94,6

5 Incluso si la invención se ha descrito con referencia a lo que actualmente parecen ser las realizaciones más prácticas y preferidas, se aprecia que la invención no se limitará a las realizaciones descritas anteriormente, sino que la invención está destinada a cubrir también diferentes modificaciones y soluciones técnicas equivalentes dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Método para controlar una biopelícula, para eliminar una biopelícula formada y/o para controlar el crecimiento de microorganismos, preferiblemente bacterias, en un medio acuoso de un proceso de fabricación industrial que comprenda material de fibra celulósica, administrando al medio acuoso del proceso una composición que comprende un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en 3-[(4-metilfenil)sulfonil]-2-propenonitrilo y 4-amino-N-2-tiazolil-bencenosulfonamida.
- 2.** Método según la reivindicación 1, **caracterizado por** administrar la composición al medio acuoso en una cantidad de 0,01-100 ppm, preferiblemente de 0,01-10 ppm, más preferiblemente de 0,01-2 ppm, calculada como compuesto activo.
- 10 **3.** Método según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por** administrar la composición al medio acuoso en una cantidad de 0,01-1 ppm, preferiblemente 0,01-0,5 ppm, más preferiblemente 0,01-0,3 ppm, calculada como compuesto activo.
- 15 **4.** Método según la reivindicación 1, 2 o 3, **caracterizado porque** el medio acuoso comprende bacterias que pertenecen al género de *Meiothermus*, *Deinococcus* y/o *Pseudoxanthomonas*, ya sean solas o en cualquier combinación, o el medio acuoso está en contacto con una biopelícula al menos parcialmente formada por cualquiera de dichas bacterias.
- 20 **5.** Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-4, **caracterizado por** administrar la composición a un proceso de fabricación industrial que comprende material de fibra celulósica, que se selecciona de la fabricación de papel, cartón, pasta de papel, tejidos, pasta de papel moldeada, materiales no tejidos o viscosa, preferiblemente fabricación de pasta de papel, papel o cartón.
- 6.** Método según la reivindicación 5, **caracterizado por** administrar la composición al medio acuoso, que comprende una cantidad residual de peróxido de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 ppm.
- 25 **7.** Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-6, **caracterizado porque** el medio acuoso comprende agua; fibras celulósicas, preferiblemente fibras lignocelulósicas; y adicionalmente opcionalmente almidón; partículas minerales inorgánicas, tales como cargas y/o minerales de revestimiento; hemicelulosas; lignina y/o sustancias disueltas y coloidales.
- 8.** Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-7, **caracterizado porque** la temperatura del medio acuoso es al menos 40°C, preferiblemente al menos 50°C.
- 30 **9.** Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-8, **caracterizado por** administrar la composición periódicamente en el medio acuoso 6-24 veces al día durante 3-45 minutos, preferiblemente 12-24 veces al día durante 10-30 minutos.
- 10.** Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **caracterizado por** usar la composición además de con otros agentes biocidas o antimicrobianos.
- 35 **11.** Método según la reivindicación 10, **caracterizado por** administrar la composición al medio acuoso, que comprende una cantidad residual de halógeno activo en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 ppm, dada como cloro activo.