

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 353**

51 Int. Cl.:
C07C 219/06 (2006.01)
A61K 8/41 (2006.01)
A61Q 19/10 (2006.01)
A01N 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07113600 .6**
96 Fecha de presentación: **01.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1892236**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **YODUROS DE ÉSTERES DE ÁCIDO GRASO DE DIMETILAMINOETANOL CON ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA, MICOSTÁTICA, ESTÁTICA RESPECTO A LEVADURAS Y/O MICROBICIDA PARA SU USO EN FORMULACIONES DE LIMPIEZA O DE PURIFICACIÓN.**

30 Prioridad:
03.08.2006 IT MI20061551

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2011

73 Titular/es:
SCHARPER S.P.A.
VIA A. MANZONI 45
20121 MILANO, IT

72 Inventor/es:
Razzano, Gianni

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 368 353 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

Yoduros de ésteres de ácido graso de dimetilaminoetanol con actividad bacteriostática, micostática, estática respecto a levaduras y/o microbicida para su uso en formulaciones de limpieza o de purificación

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a agentes con actividad bacteriostática, micostática y estática respecto a levaduras y/o microbicida que se usarán en formulaciones de purificación o de limpieza para la piel, las mucosas y el oído, y a un proceso para preparar dichos agentes.

Estado de la técnica

[0002] El documento US 6.420.330 describe microbicidas constituidos por sales de éster de alcanolamina de ácido carboxílico cuaternario y más particularmente:

- sales de mono-, di- y triéster de alquiltrietanolamina,
- sales de mono-, y diéster de dialquildietanolamina,
- sales de monoéster de trialquiletanolamina.

[0003] Estos productos se obtienen usando esencialmente un proceso de 3 etapas:

- 1) Mono-, di- o triesterificación de la mono-, di- o trialcanolamina correspondiente mediante transesterificación,
- 2) posterior cuaternización por medio de un haluro de alquilo, obteniendo de este modo la sal cuaternaria correspondiente del mono-, di- o triéster de haluro de mono-, di- o trialcanolammonio,
- 3) conversión opcional en la sal deseada mediante reacción de intercambio con una sal alcalina o alcalinotérrica que tiene el anión deseado (es decir formiato, acetato, tartrato, dicarboxilato, un haluro diferente del presente al final de la etapa (2), sulfato o nitrato).

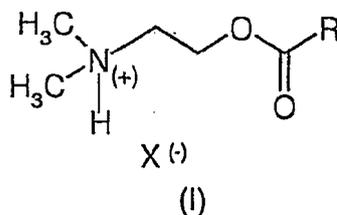
[0004] Esta síntesis presenta una serie de desventajas, principalmente la necesidad de formar una sal de amonio cuaternario mediante reacción con agentes alquilantes tales como haluros de alquilo que son tóxicos y la necesidad de operar, al menos en las primeras dos etapas, en presencia de disolventes orgánicos.

[0005] En los campos de las formulaciones cosméticas y la limpieza de la piel, existe una necesidad cada vez mayor del suministro de sustancias que sean lo mejor toleradas y más biocompatibles posible y además que puedan sintetizarse al tiempo que se evita o al menos se reduce el uso de disolvente orgánico y reactivo tóxico, usando, por lo tanto, reactivos que son, a su vez, biocompatibles.

[0006] Un reactivo que puede clasificarse de este modo es, por ejemplo, dimetilaminoetanol, es decir una sustancia que se encuentra a bajas concentraciones en el cerebro humano y en algunos alimentos (sardinas y anchoas) y que es un ingrediente usado recientemente en formulaciones cosméticas como loción tonificante cutánea con actividad anti-arrugas.

Sumario

[0007] El Solicitante ha preparado ahora nuevas sales de ésteres de ácido graso de dimetilaminoetanol de fórmula general (I)



en la que R es un radical alquilo C₆-C₁₆ lineal o ramificado, X⁻ = I⁻, y que, además de ser biocompatible, tiene actividad bacteriostática, micostática, estática respecto a levaduras y/o microbicida.

[0008] Además de tener dichas propiedades, estas sales son lo suficientemente hidrosolubles con propiedades tensioactivas, de modo que dichas soluciones acuosas, que las contienen, forman una cantidad sustancial de espuma.

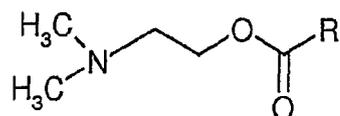
[0009] Estas sales pueden usarse, por lo tanto, ventajosamente en formulaciones de purificación o de limpieza de la

piel, las mucosas y el pabellón auricular.

[0010] Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención son dichas formulaciones de limpieza o de desinfección para la piel, las mucosas o el oído que comprenden al menos uno de dichos agentes con actividad bacteriostática, micostática, estática respecto a levaduras y/o microbicida.

[0011] Un aspecto adicional de la presente invención es un proceso para preparar la sal de fórmula (I) que comprende las siguientes etapas:

a) esterificar dimetilaminoetanol con un haluro de fórmula RCOX' , en la que X' es un halógeno seleccionado entre cloruro y bromuro, opcionalmente en presencia de un aceptor de iones hidrógeno, obteniendo de este modo el éster de fórmula (II),



(II)

en la que R tiene los significados mencionados anteriormente,

b) salificar el éster de fórmula (II) tratando la mezcla de reacción obtenida de la etapa (a) con ácido HX'' , en la que $\text{X}'' = \text{I}$, para obtener las sales de fórmula (I).

Descripción de la figura

[0012]

La figura 1 representa el espectro IR de miristato de yoduro de etildimetilamonio preparado como se describe en el ejemplo 3.

La figura 2 muestra la curva de letalidad con respecto a *P. aeruginosa* obtenida para las concentraciones de Control, 1, 2, 4 x CIM de miristato de yoduro de etildimetilamonio.

La figura 3 muestra la curva de letalidad con respecto a *Staphylococcus aureus* OXA-S obtenida para las concentraciones de Control, 1, 2, 4 x CIM de miristato de yoduro de etildimetilamonio.

La figura 4 muestra la curva de letalidad con respecto a *Staphylococcus aureus* OXA-R obtenida para las concentraciones de Control, 1, 2, 4 x CIM de miristato de yoduro de etildimetilamonio.

La figura 5 muestra la curva de letalidad con respecto a *Staphylococcus epidermidis* OXA-R obtenida para las concentraciones de Control, 1, 2, 4 x CIM de miristato de yoduro de etildimetilamonio.

La figura 6 muestra la curva de letalidad con respecto a *Staphylococcus epidermidis* OXA-S obtenida para las concentraciones de Control, 1, 2, 4 x CIM de miristato de yoduro de etildimetilamonio.

La figura 7 muestra la curva de letalidad con respecto a *Streptococcus pyogenes* obtenida para las concentraciones de Control, 1, 2, 4 x CIM de miristato de yoduro de etildimetilamonio.

La figura 8 muestra la curva de letalidad con respecto a *Candida albicans* obtenida para las concentraciones de Control, 1, 2, 4 x CIM de miristato de yoduro de etildimetilamonio

Descripción detallada de la invención

[0013] En resumen, la invención se refiere a sales de fórmula (I). Se prefieren sales en las que R es un radical alquilo C_{10} - C_{14} lineal o ramificado. Más preferiblemente, R es un radical alquilo C_{13} lineal, es decir el ácido graso del éster es ácido mirístico.

[0014] De acuerdo con la invención, X' es yoduro.

[0015] A este respecto, las sales de la invención que presentan un anión yoduro pueden prepararse mediante el proceso de la invención realizando las etapas (a) y (b) en un disolvente acuoso y usando hidróxido sódico en la etapa (a) como aceptor de iones hidrógeno. En este caso, después de añadir ácido clorhídrico, el yoduro precipita al enfriarse y puede separarse de la mezcla de reacción mediante filtración.

[0016] Las formulaciones de purificación o de limpieza cutánea de la presente invención contienen preferiblemente las sales de la presente invención a concentraciones entre el 0,001 y el 1%, más preferiblemente a concentraciones entre el 0,05 y el 0,1% en peso respecto al peso total de la formulación.

[0017] Las formulaciones de limpieza o de purificación para la piel y las mucosas de la presente invención son preferiblemente de base acuosa y contienen preferiblemente aditivos usados habitualmente en formulaciones de limpieza, tales como tensioactivos catiónicos, anfóteros y no iónicos y conservantes, etc.

[0018] Las formulaciones de limpieza o de purificación adecuadas para la piel de la presente invención están preferiblemente en forma de jabones, lociones o emulsiones anti-espínillas y anti-acné o en forma de champúes anti-caspa.

[0019] Las formulaciones de limpieza o de purificación adecuadas para las mucosas son adecuadas en particular como limpiadoras para higiene íntima y están en forma de lociones o emulsiones fluidas.

[0020] Las formulaciones de limpieza o de purificación de oídos de acuerdo con la presente invención están preferiblemente en forma de soluciones acuosas, más preferiblemente soluciones fisiológicas, y también pueden contener tensioactivos auxiliares.

[0021] Los siguientes ejemplos de la preparación de las sales de fórmula (I) y las evaluaciones relativas de actividad bacteriostática, micostática, estática respecto a levaduras y/o microbicida se proporcionan a modo de ilustración no limitante.

EJEMPLO 1 - Preparación de laurato de yoduro de etildimetilamonio

[0022] Se prepara una solución de 8,9 g de dimetilaminoetanol y 4,0 g de hidróxido sódico en 70 g de agua. Se añaden lentamente 21,8 g de cloruro de lauroilo a temperatura ambiente a la solución mencionada anteriormente mantenida en agitación. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se calienta a 80°C durante 2 horas hasta que se vuelve transparente. A continuación se enfría a temperatura ambiente y se añaden 22,4 g de ácido yodhídrico al 57% p/p. Esto se enfría a continuación a temperatura ambiente y se obtiene un precipitado cristalino que se retira por filtración y se seca: rendimiento de la reacción: 85%.

EJEMPLO 2 - Preparación de miristato de yoduro de etildimetilamonio

[0023] Siguiendo el mismo método operativo que el usado en el ejemplo anterior con la única diferencia de que el cloruro de lauroilo es sustituido por la misma cantidad de cloruro de miristilo, se obtiene miristato de yoduro de etildimetilamonio. El producto final, separado de la mezcla de reacción mediante filtración, se recristaliza a partir de una mezcla de etanol:agua (1:1) y se seca a temperatura ambiente al vacío: punto de fusión del producto: 54°C; rendimiento de la reacción: 75%.

[0024] El producto cristalizado se analiza con un espectrómetro IR de Perkin Elmer, estando representado el espectro relativo en la figura 1 a partir de la cual puede verse que:

- Los picos en aproximadamente 3000 cm^{-1} se refieren a la cadena alifática del éster
- Los picos en 3366 y 2452 cm^{-1} se refieren al nitrógeno cuaternario, y
- El pico en 1713 cm^{-1} se refiere al pico de CO presente en el grupo éster.

EJEMPLO 3 - Preparación de laurato de cloruro de etildimetilamonio (comparativo)

[0025] 8,9 g de dimetilaminoetanol se disuelven en 40 g de tolueno. A esta solución se le añaden 5 g de resina catiónica Amberlite IRA 400 (resina catiónica mediante reticulación de bencil-dimetil(2-hidroxi)etil)amonio) con agitación. Se añaden lentamente 21,8 g de cloruro de lauroilo. La mezcla se calienta a continuación a reflujo durante 2 horas. Después de enfriarla, la masa solidifica. A continuación se añaden 25 g de etanol, y después de calentarla a 70°C la resina se retira por filtración y la mezcla se enfría a temperatura ambiente. A continuación se obtiene un precipitado cristalino que se separa de la mezcla de reacción y se seca al vacío a temperatura ambiente en un horno.

Rendimiento de la reacción: 75%.

EJEMPLO 4 - Preparación de laurato de bromuro de etildimetilamonio (comparativo)

[0026] Siguiendo el mismo método operativo que el usado en ejemplo 3, con la única diferencia de que el cloruro de lauroilo es sustituido por la misma cantidad de bromuro de lauroilo, se obtuvo el compuesto del título. Rendimiento de la reacción: 70%.

Evaluación de la actividad bacteriostática, micostática y estática respecto a levaduras

[0027] se realizaron ensayos usando protocolos turbidimétricos convencionales de evaluación de la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) del miristato de yoduro de etildimetilamonio en ambas colonias de recogida y en

otras cepas disponibles. Los valores se expresaron en ppm y representan los límites de concentración en solución acuosa de dicha sal, por encima de los cuales no es evidente más crecimiento biológico.

Cepa	CIM (ppm)
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC11229	15
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15

5 [0028] Los valores anteriores, cuando se expresan en % de concentración (p/p), están entre el 0,002 y el 0,025%.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de miristato de yoduro de etildimetilamonio

10 [0029] Se realizó un estudio con el objetivo de caracterizar la actividad antimicrobiana del miristato de yoduro de etildimetilamonio contra microorganismos pertenecientes a las siguientes especies:

- *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a oxacilina/meticilina, indicados brevemente como Oxa-R *S. aureus* y Oxa-S *S. aureus* respectivamente;
- *Staphylococcus epidermidis* resistente y sensible a oxacilina/meticilina, indicados brevemente como Oxa-R *S. epidermidis* y Oxa-S *S. epidermidis* respectivamente;
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Candida albicans*
- *Streptococcus pyogenes*.

20 [0030] La cepa de control para todos los microorganismos del género *Staphylococcus* era *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* la cepa de control era *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Evaluación de la CIM y la CMM

25 [0031] Los valores de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) y Concentraciones Microbicidas Mínimas (CMM) se obtuvieron mediante el método de microdilución en caldo líquido o el método de dilución en agar de acuerdo con las Directrices del *National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico) (NCCLS).

30 [0032] Dichos métodos estipulan el inóculo de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml en pocillos de una microplaca o en agar que contiene concentraciones graduadas de miristato de yoduro de etildimetilamonio, disuelto en el sustrato de cultivo adecuado para el ensayo de microorganismos.

35 [0033] Específicamente, para determinar los valores de CIM, se usaron los siguientes caldos:

- Mueller Hinton al que se añadieron cationes para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*,
- Mueller Hinton suplementado con sangre de carnero (5%) para *Streptococcus pyogenes*,
- Sabouraud para *Candida albicans*,

40 [0034] Después de 18 horas de incubación, la concentración más baja de miristato capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo correspondía a la CIM. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla a continuación.

45 [0035] La CMM, definida como la concentración más baja de miristato de yoduro de etildimetilamonio capaz de determinar la muerte del 99,9% de la población microbiana inicial, se determinó a través del método de microdilución, sembrando una alícuota de cada pocillo de la microplaca usada para la evaluación de CIM en placas de sustrato adecuado y posteriormente mediante incubación durante 18-24 horas en el caso de las bacterias (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*) y 48-72 horas en el caso del hongo *Candida albicans*.

50 [0036] Específicamente, para determinar los valores de CMM se usaron los siguientes sustratos:

- Mueller Hinton para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*,
- Mueller Hinton suplementado con sangre de carnero (5%) para *Streptococcus pyogenes*,

55

- Sabouraud para *Candida albicans*,

[0037] Los valores obtenidos se muestran en la Tabla a continuación.

5

Tabla: CIM y CMM de miristato de yoduro de etildimetilamonio

Microorganismo	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CMM ($\mu\text{g/ml}$)
<u>Cepa de control:</u> <i>S. aureus</i> ATCC 25923	128	128
Oxa-R <i>S. aureus</i>	64	128
Oxa-R <i>S. epidermidis</i>	64	256
Oxa-S <i>S. epidermidis</i>	32	128
Oxa-S <i>S. epidermidis</i>	64	128
<u>Cepa de control:</u> <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	32	> 256
<i>P. aeruginosa</i>	32	> 256
<i>Candida albicans</i>	16	32
<i>S. pyogenes</i>	32	128

[0038] Como es evidente a partir de la Tabla, la sal de la invención tiene una buena actividad inhibidora contra bacterias y una actividad inhibidora muy buena contra el hongo *C. albicans*.

10 **[0039]** En cuanto a la CMM, la sal de la invención muestra también una buena actividad microbicida, particularmente contra *C. albicans*.

Curvas de letalidad

15 **[0040]** La cinética de letalidad se obtuvo en cepas microbianas que eran representativas de cada especie microbiana indicada anteriormente. Las concentraciones usadas de miristato de yoduro de etildimetilamonio fueron: 1, 2, 4 x CIM. Para cada microorganismo, se obtuvo la curva de crecimiento sin adición de miristato (curva de control). Las curvas de letalidad en el caldo de cultivo adecuado que contenía miristato en las concentraciones indicadas anteriormente se obtuvieron inoculando una cantidad microbiana de $1-5 \times 10^5$ ufc/ml. Después de 0, 3, 6 y 20 24 horas de incubación a 37°C las bacterias que seguían presentes se contaron, sembrando, por duplicado, una alícuota de caldo de cultivo en placas que contenían el sustrato adecuado. Para *Candida albicans*, la incubación se prolongó hasta 48-72 horas. Se consideraba que la actividad antimicrobiana era microbicida, cuando una disminución de al menos 3 log de recuentos microbianos, con respecto al inóculo inicial, estaba presente, mientras que en caso de una disminución inferior a 3 log, la actividad antimicrobiana se consideraba como estática.

25 **[0041]** Específicamente, para obtener las curvas de letalidad se usaron los siguientes sustratos:

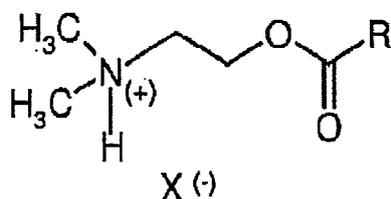
- Mueller Hinton para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*,
- Mueller Hinton suplementado con sangre de caballo lisada (5%) para *Streptococcus pyogenes*,
- 30 - Sabouraud para *Candida albicans*.

[0042] Las curvas de letalidad se representan en las figuras adjuntas 2-8. Como puede observarse a partir de las figuras 3-7, la sal de la invención muestra actividad microbicida contra especies ensayadas de *Staphylococcus* y *Streptococcus* a concentraciones de 2 x CIM y 4 x CIM, y actividad bacteriostática a concentración más baja. En lo que respecta a la actividad contra *P. aeruginosa* de la figura 2, el compuesto de la invención muestra actividad antimicrobiana predominantemente estática. Ventajosamente, la actividad microbicida de la sal de la invención contra *C. albicans* de la figura 8 era alta, incluso a una concentración de 1 x CIM.

35

REIVINDICACIONES

1. Sales de ésteres de ácido graso de dimetilaminoetanol de fórmula general (I)



(I)

5 en la que R es un radical alquilo C₆-C₁₆ lineal o ramificado, X⁻ = I⁻.

2. Sales de acuerdo con la reivindicación 1, en las que R es un radical alquilo C₁₀-C₁₄ lineal o ramificado.

3. Sales de acuerdo con la reivindicación 2, en las que R es un radical alquilo C₁₃ lineal.

10 4. Uso de sales de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, como agentes bacteriostáticos, micostáticos, estáticos respecto a levaduras y/o microbicidas.

15 5. Formulaciones que comprenden al menos una sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que se dice que al menos una sal está a concentraciones entre el 0,001 y el 1% en peso, del peso total de la formulación.

6. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 5, en las que dicha concentración está entre el 0,05 y el 0,1%.

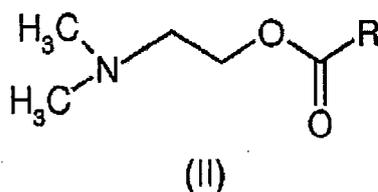
20 7. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, para limpiar o purificar la piel o las mucosas, siendo dichas formulaciones de base acuosa.

25 8. Formulaciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, estando dichas formulaciones en forma de jabones, lociones o emulsiones anti-acné.

9. Formulaciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, estando dichas formulaciones en forma de champú anti-caspa.

30 10. Proceso para preparar sales de fórmula general (I) que comprende las siguientes etapas:

a) esterificar dimetilaminoetanol con un haluro de fórmula RCOX', en el que X' es un halógeno seleccionado entre cloruro y bromuro, obteniendo de este modo el éster de fórmula (II),



(II)

35 en la que R es un radical alquilo C₆-C₁₆ lineal o ramificado,

b) salificar el éster de fórmula (II) tratando a la mezcla de reacción obtenida de la etapa (a) con el ácido HX'', en el que X'' = I, para obtener las sales de fórmula (I).

40 11. Proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la etapa (a) se realiza en presencia de un aceptor de iones hidrógeno.

45 12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11 para preparar la sal de fórmula (I) en la que X⁻ = I⁻, en el que las etapas (a) y (b) se realizan en un disolvente acuoso y en la etapa (a) se usa hidróxido sódico como aceptor de iones hidrógeno, y al completarse la etapa (b) después de añadir una cantidad estequiométrica de ácido yodhídrico, la sal precipita directamente a partir de la mezcla de reacción acuosa al enfriarla.

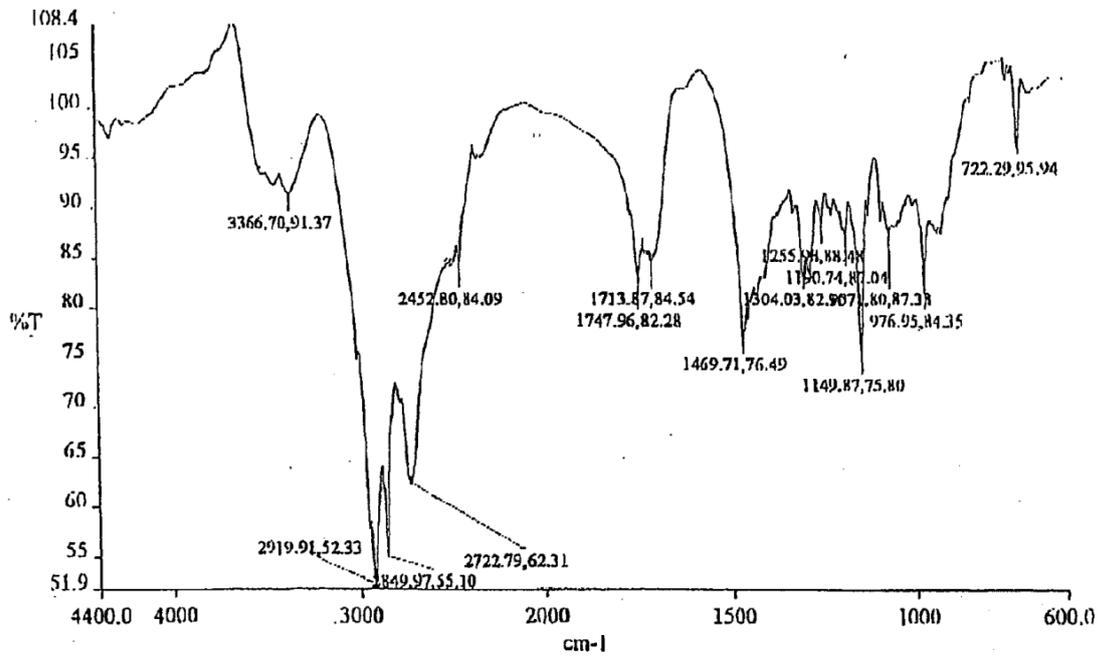


Fig.1

Pseudomonas aeruginosa

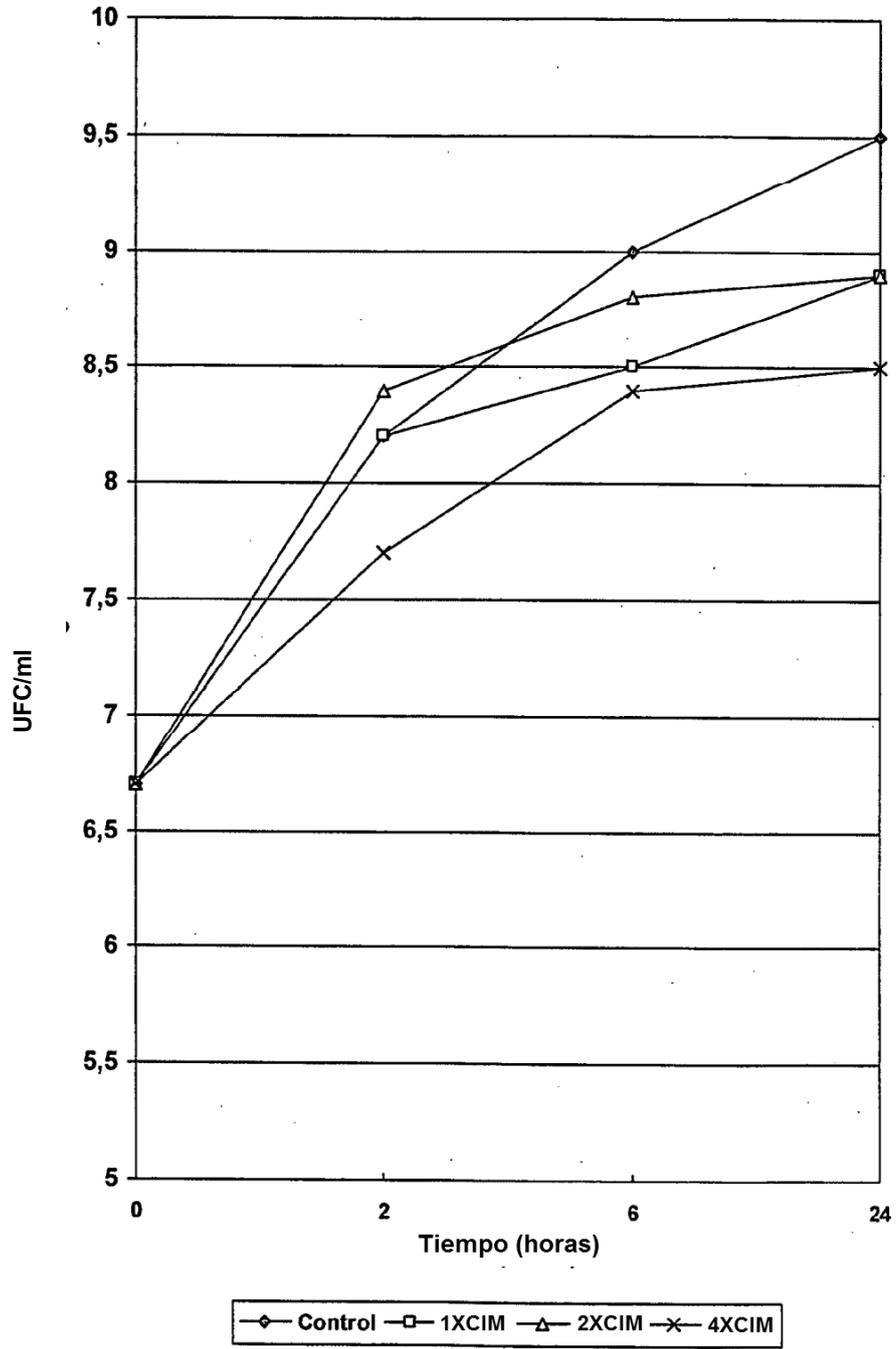


Figura 2

Staphylococcus aureus OXA-S

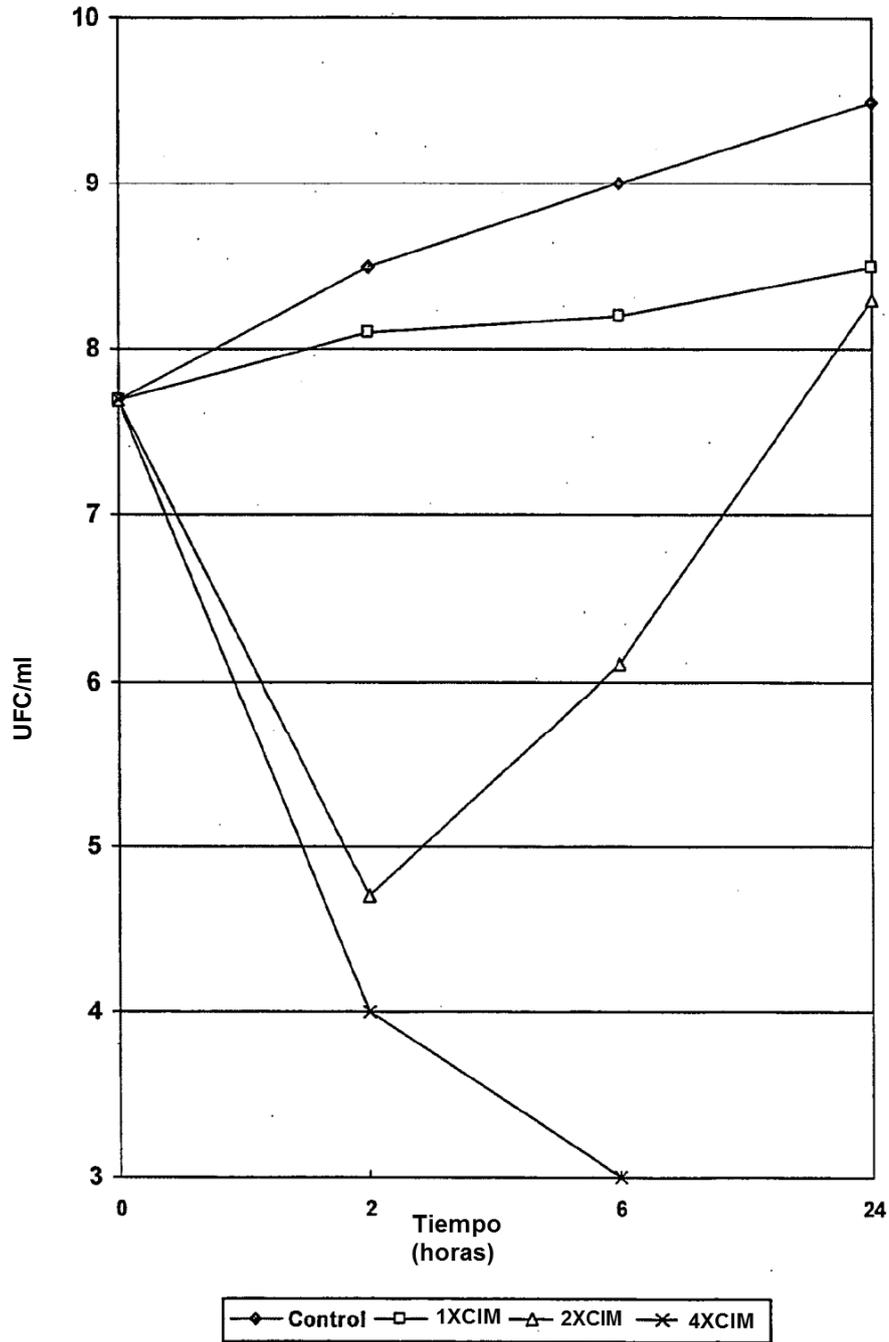


Figura 3

Staphylococcus aureus OXA-R

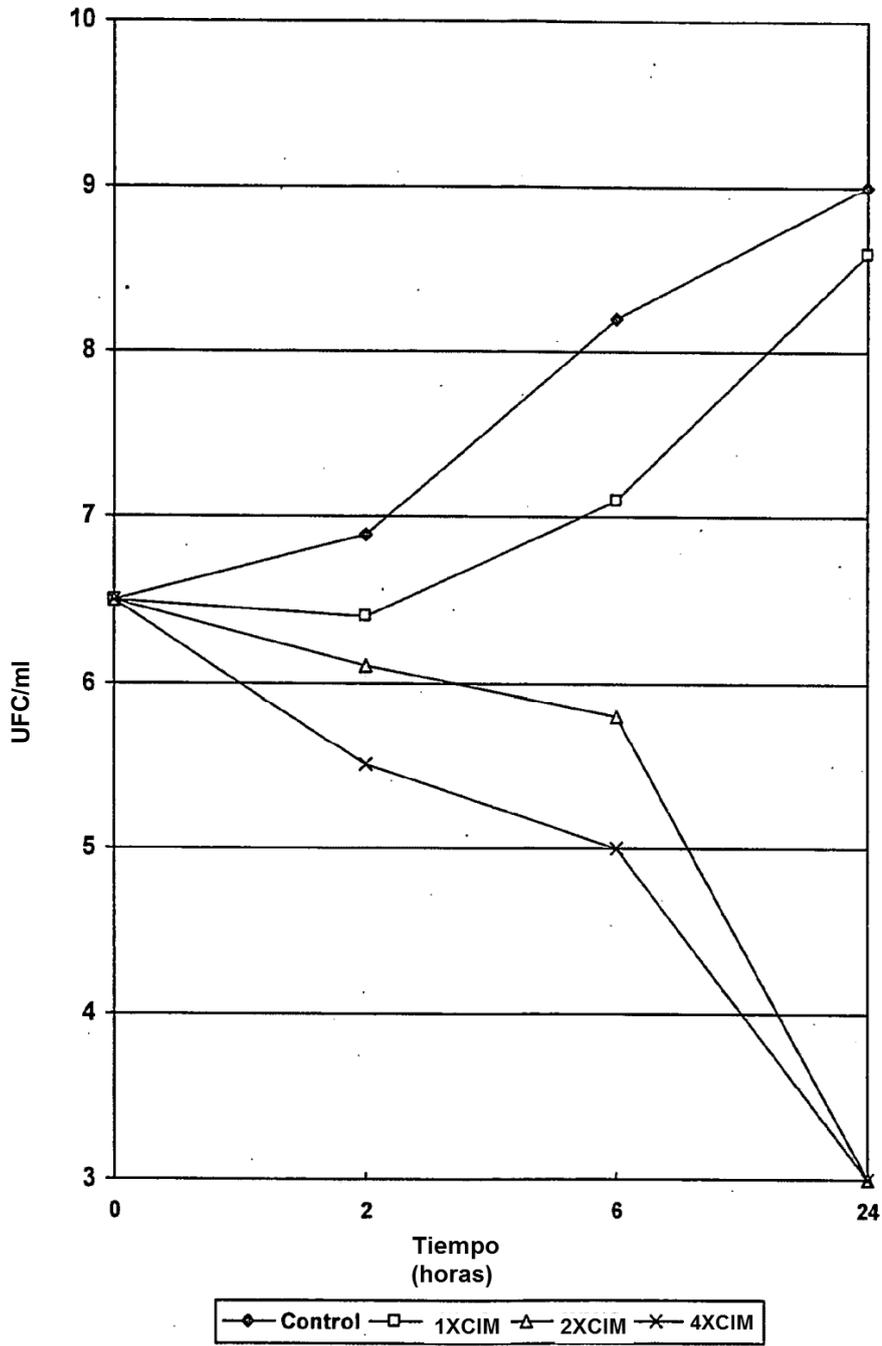


Figura 4

Staphylococcus epidermidis OXA-R

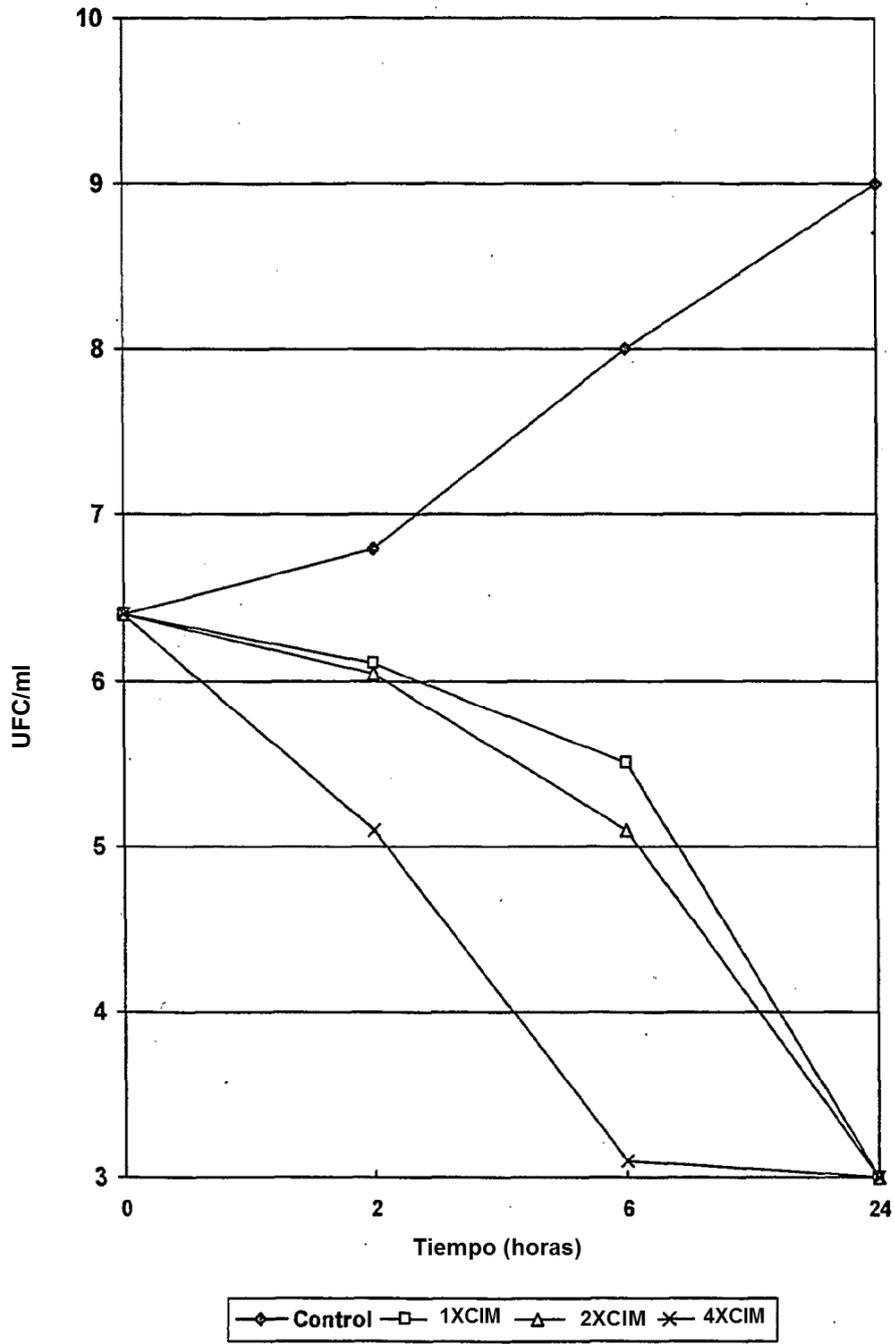


Figura 5

Staphylococcus epidermidis OXA-S

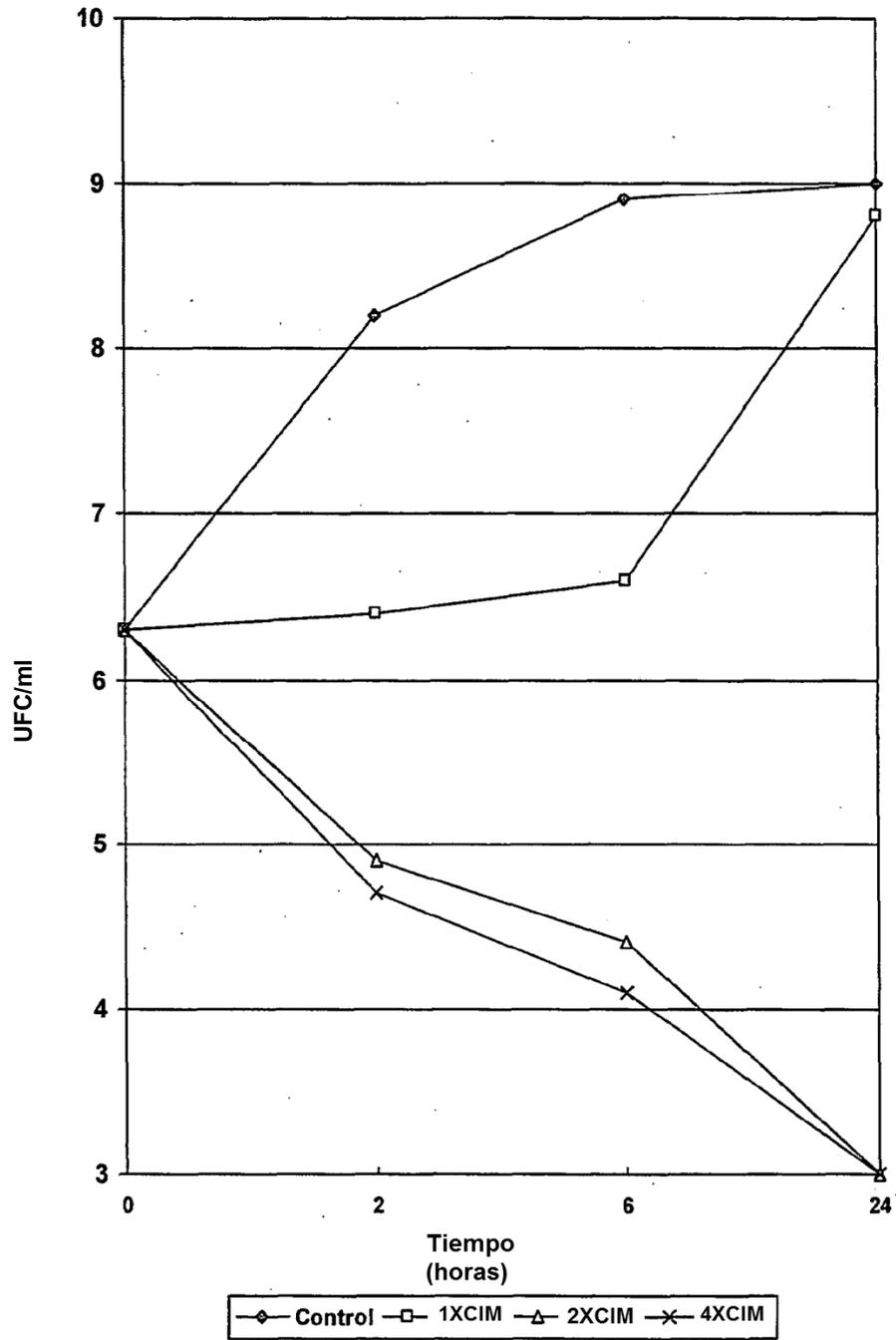


Figura 6

Streptococcus pyogenes

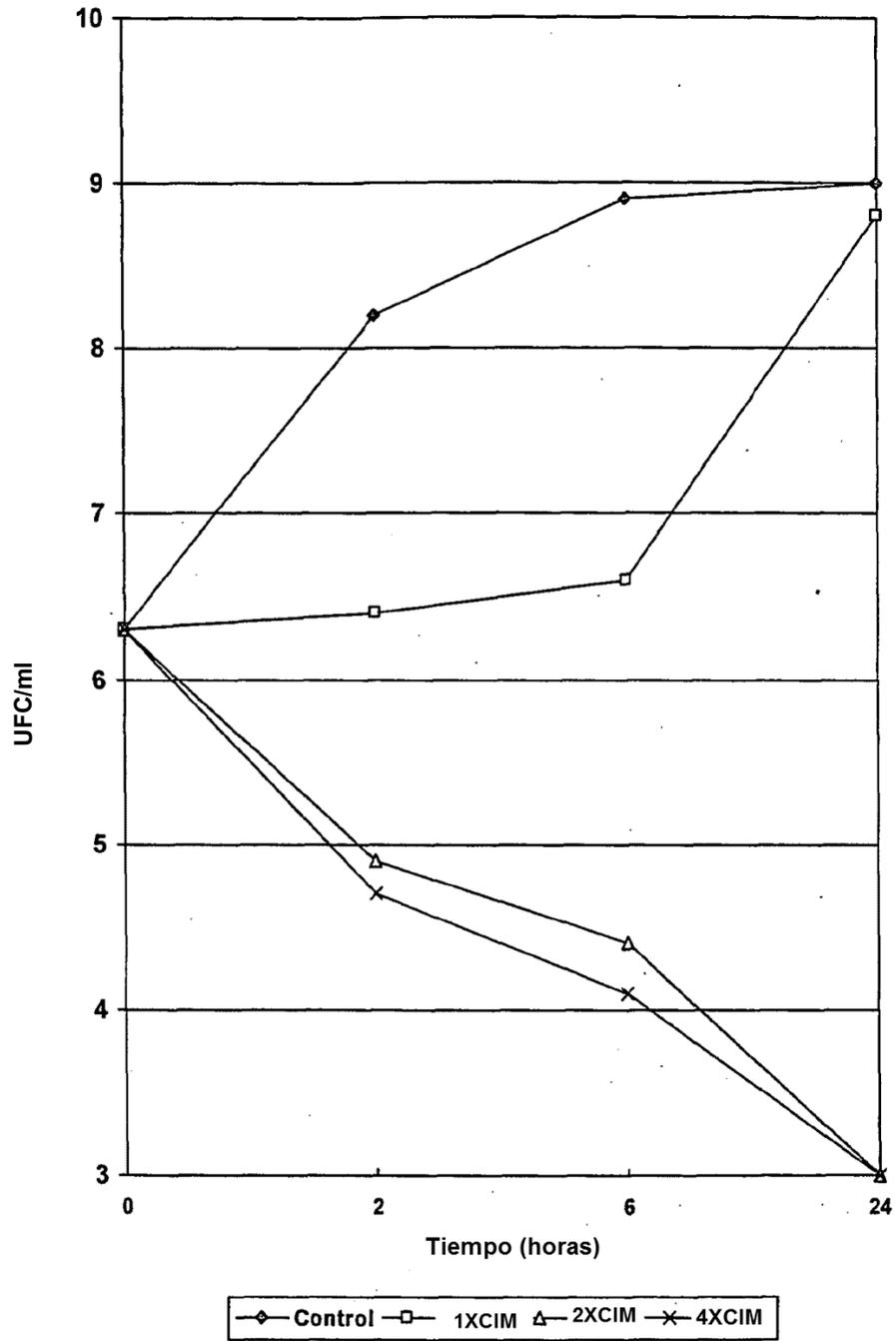


Figura 7

Candida albicans

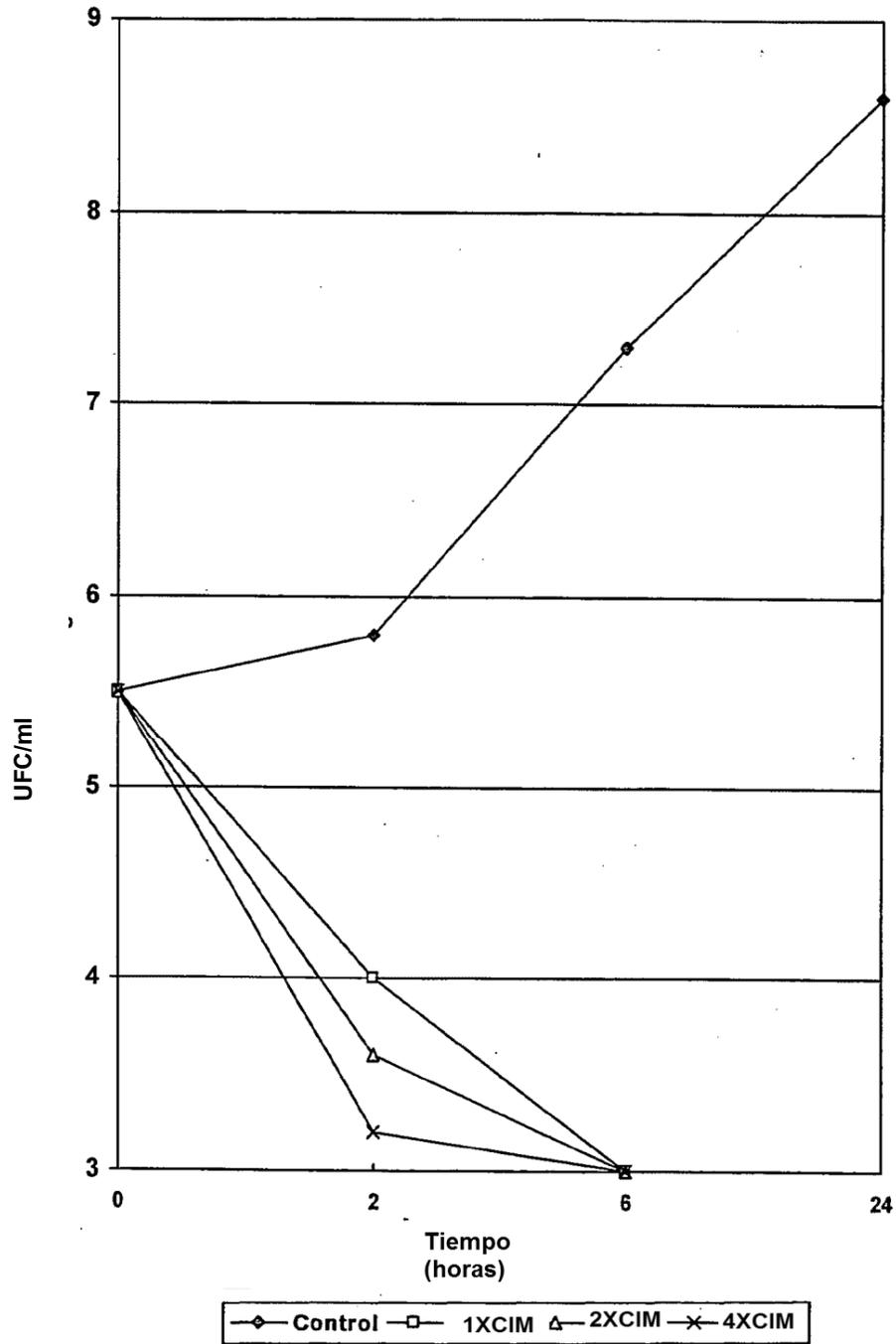


Figura 8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 6420330 B [0002]