

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 790**

51 Int. Cl.:

A01N 31/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010** **E 10719820 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2429288**

54 Título: **Efecto antimicrobiano de agentes antimicrobianos del tipo de diol cicloalifático en composiciones de revestimiento**

30 Prioridad:

15.05.2009 US 178707 P
13.05.2010 US 779161

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2013

73 Titular/es:

EASTMAN CHEMICAL COMPANY (100.0%)
200 South Wilcox Drive
Kingsport, TN 37660, US

72 Inventor/es:

MCCAULLEY, JAMES ALLEN;
OLDFIELD, TERRY ANN;
MATOSKY, ANDREW JOSEPH;
DOBBS, SUZANNE WINEGAR y
CHRISTIAN, VICKY LYNN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 434 790 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

Efecto antimicrobiano de agentes antimicrobianos del tipo de diol cicloalifático en composiciones de revestimiento

Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente de los Estados Unidos número de serie 60/901.615 titulada "ANTIMICROBIAL EFFECT OF CYCLOALIPHATIC DIOL ANTIMICROBIAL AGENTS IN COATING COMPOSITIONS" presentada el 15 de mayo de 2009.

Campo de la invención

Esta invención se refiere en general al campo de composiciones acuosas de revestimiento y, en particular, a agentes antimicrobianos para uso en composiciones acuosas de revestimiento.

10 Antecedentes de la invención

- Los productos acuosos de revestimiento contienen típicamente agua y compuestos orgánicos a un nivel que los hace susceptibles de crecimiento microbiano. Se puede producir contaminación por bacterias, levadura o moho durante su fabricación o durante su uso por los consumidores. Los microbios contaminantes introducidos durante la fabricación tienen tiempo considerable para crecer durante el almacenamiento y transporte, en las estanterías de almacenamiento en el punto de venta y antes de su uso. Durante su uso, se puede producir contaminación debido al contacto del producto de revestimiento con utensilios, contenedores secundarios y usuarios.

- Típicamente se añaden agentes antimicrobianos a revestimientos acuosos o a ingredientes de revestimientos acuosos para limitar el crecimiento de bacterias, levadura o moho en el producto. Hay un número muy limitado de productos químicos antimicrobianos disponibles para este fin. El tipo de agente antimicrobiano o combinación de agentes (esto es, sistema antimicrobiano) y su concentración en el producto se seleccionan basándose en el tipo de producto a preservar, eficacia del agente y tipos de organismos que contaminan probablemente al producto.

- Los sistemas antimicrobianos están limitados además a concentraciones por debajo de las cuales se consideran inocuas para su uso en base a consideraciones medioambientales o sanitarias. Se sabe que algunos agentes originan sensibilización cutánea en individuos susceptibles y, por lo tanto, están limitados a ciertas concentraciones por regulaciones gubernamentales.

- Se han identificado glicoles que tienen actividad antimicrobiana de modo que cuando se usan a concentraciones eficaces en revestimientos y en otros diversos productos, el glicol puede aumentar o intensificar el sistema antimicrobiano usado. Estos glicoles incluyen propilenglicol, dipropilenglicol, tripropilenglicol y 1,3-butilenglicol.

- En la técnica hay necesidad de agentes y sistemas antimicrobianos adicionales más eficaces para uso en composiciones y dispersiones acuosas de revestimiento. La presente invención está dirigida a resolver esta necesidad así como otras que serán evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones.

Resumen de la invención

En una realización, la presente invención proporciona una composición de revestimiento que comprende:

- 35 (a) por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol en una cantidad de 0,1 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento,
- (b) agua, y
- (c) un aglutinante.

- 40 En otra realización, la invención proporciona una composición de revestimiento que comprende:

- (a) un sistema antimicrobiano que comprende por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol y por lo menos un segundo agente antimicrobiano,
- 45 (b) agua, y
- (c) un aglutinante,

en la que el agente antimicrobiano está presente en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la composición de revestimiento y en la que la citada composición de revestimiento se selecciona del grupo que consiste en revestimiento de paredes planas y no planas, imprimación, imprimación plástica, sellador, imprimación

por debajo del revestimiento, revestimiento de suelos, revestimiento de tejados, revestimiento antiadherente, compuesto de curado de hormigón, sellador de calzadas, revestimiento seco, revestimiento de acabado de imitación, compuesto de desmoldeo, revestimiento de mantenimiento industrial, laca, revestimiento con estructura de masilla, revestimiento de esmalte, revestimiento antioxidante, sellador de lijado, tintes, revestimientos de piscinas, revestimientos de señales de tráfico, barnices, selladores impermeabilizantes y composiciones protectoras de la madera.

En otra realización, la invención proporciona un método para reducir o inhibir crecimiento microbiano en una composición de revestimiento, que comprende añadir por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol a una composición de revestimiento que comprende agua y un aglutinante, en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la composición de revestimiento.

En otra realización, la invención proporciona un método para reducir o inhibir crecimiento microbiano en una composición de revestimiento, que comprende:

añadir un sistema antimicrobiano que comprende por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol y por lo menos un segundo agente antimicrobiano, a una composición de revestimiento que comprende agua y un aglutinante, en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la composición de revestimiento.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente se ha descubierto que por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol (1,1-CHDM), ciclohexano-1,2-dimetanol (1,2-CHDM), ciclohexano-1,4-dimetanol (1,4-CHDM) y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol (TMCBD) es eficaz como agente antimicrobiano en composiciones acuosas de revestimiento. Adicionalmente, este agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático puede aumentar la eficacia de agentes antimicrobianos tradicionales usados en revestimientos. Cuando se usa combinado, este nuevo agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático puede permitir una reducción del número y/o concentración de los agentes individuales usados en la composición de revestimiento. Los agentes antimicrobianos tradicionales que se pueden usar como parte de los sistemas antimicrobianos mejorados de la invención incluyen los descritos por Kappock en "Biocides in Wet State and Dry Film", *Handbook of Coatings Additives*, páginas 272-275 (2ª edición, 2004). Por ejemplo, los agentes antimicrobianos del tipo de diol cicloalifático pueden aumentar la actividad antimicrobiana de los agentes antimicrobianos de revestimiento usados más comúnmente, incluidos la metilisotiazolinona (MIT), clorometilisotiazolinona, bencisotiazolinona (BIT), 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano y 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol.

En una realización, los agentes antimicrobianos del tipo de diol cicloalifático son una mezcla de isómeros cis y trans. Por ejemplo, el 1,4-CHDM puede tener una proporción cis/trans de aproximadamente 31/69.

Así, en una realización, la presente invención proporciona una composición de revestimiento que comprende:

- (a) por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol en una cantidad de 0,1 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento.
- (b) agua, y
- (c) un aglutinante.

La cantidad del agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático usado puede variar dependiendo de varios factores, incluidos el grado de protección antimicrobiana deseada, grado de exposición a contaminantes microbianos y compatibilidad del diol cicloalifático con los otros ingredientes de la composición de revestimiento. Típicamente, la cantidad del agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático presente en la composición de revestimiento puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento. Preferiblemente, el agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en el intervalo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 4 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento. Otros intervalos son de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 y de aproximadamente 1 a aproximadamente 3,5 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento.

La composición de revestimiento de acuerdo con la invención contiene agua. El agua está presente típicamente en una cantidad que varía de 40 a 70 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento.

El aglutinante de la composición de revestimiento de la invención se refiere a un componente que forma una película. El aglutinante imparte adherencia, une entre sí los pigmentos (si están presentes) e influye en las propiedades del revestimiento resultante, como brillo, duración, flexibilidad y dureza. Los aglutinantes pueden ser resinas naturales o sintéticas, como resinas acrílicas, poliuretanos, poliésteres, resinas de melamina, resinas epoxídicas y aceites. En una realización, el aglutinante comprende partículas poliméricas, como las usadas en pinturas de látex. La composición de revestimiento contiene típicamente 30 a 60 por ciento en peso del aglutinante, basado en el peso de la composición de revestimiento.

La composición de revestimiento de la invención puede incluir pigmentos o colorantes. El pigmento puede estar presente en una cantidad de 30 a 60 por ciento en peso, basado en el peso total de la composición. Ejemplos de pigmentos adecuados incluyen dióxido de titanio, baritas, talco, carbonato cálcico, pigmento CI Blanco 6 (dióxido de titanio), pigmento CI Rojo 101 (óxido de hierro rojo), pigmento CI Amarillo 42, pigmento CI Azul 15, 15:1, 15:2, 15:3 y 15:4 (ftalocianinas de cobre), pigmento CI Rojo 49:1 y pigmento CI Rojo 57:1.

La composición de revestimiento de la invención también puede incluir uno o más de otros aditivos, como catalizadores, espesantes, estabilizadores, emulsionantes, estructurantes, promotores de la adherencia, estabilizadores UV, aplanadores, agentes de control de la fluidez, extensores, plastificantes, agentes humectantes de pigmentos, agentes dispersantes de pigmentos, agentes desespumantes, agentes antiespumantes, agentes contra la sedimentación, agentes contra la compactación e inhibidores de la corrosión.

La composición de revestimiento también puede contener 0 a 30 por ciento en peso, basado en el peso total de la composición de revestimiento, de un disolvente orgánico miscible con agua. Ejemplos de dichos disolventes incluyen, pero sin carácter limitativo, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, sec-butanol, isobutanol, etilenglicol, monobutil éter, propilenglicol n-butil éter, propilenglicol metil éter, propilenglicol monopropil éter, dipropilenglicol metil éter y dietilenglicol monobutil éter.

La composición de revestimiento de la invención se puede formular para que sea un revestimiento de paredes planas y no planas, imprimación, imprimación plástica, sellador, imprimación por debajo del revestimiento, revestimiento de suelos, revestimiento de tejados, revestimiento antiadherente, compuesto de curado de hormigón, sellador de calzadas, revestimiento seco, revestimiento de acabado de imitación, compuesto de desmoldeo, revestimiento de mantenimiento industrial, laca, revestimiento con estructura de masilla, revestimiento de esmalte, revestimiento antioxidante, sellador de lijado, tintes, revestimientos de piscinas, revestimientos de señales de tráfico, barnices, selladores impermeabilizantes o composiciones protectoras de la madera.

En la composición de revestimiento de la presente invención el agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático se puede usar solo o combinado con uno o más agentes antimicrobianos adicionales. El agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático puede proporcionar un efecto intensificador de la actividad antimicrobiana a concentraciones que varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento. En otra realización, el agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en el intervalo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 4 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento. Otros intervalos son de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 y de aproximadamente 1 a aproximadamente 3,5 por ciento en peso. El intervalo superior de concentración estará limitado por la compatibilidad de otros ingredientes de la composición de revestimiento con el agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático. En otra realización de la invención, el intervalo de concentración del agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático, cuando se usa combinado con otros agentes antimicrobianos, es 0,4 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento.

Los otros agentes antimicrobianos o segundos agentes antimicrobianos que se pueden usar como parte de los sistemas antimicrobianos mejorados de la invención incluyen los descritos por Kappock en "Biocides in Wet State and Dry Film", *Handbook of Coatings Additives*, páginas 272-275 (2ª edición, 2004). Dichos segundos agentes antimicrobianos incluyen metilisotiazolinona (MIT), clorometilisotiazolinona, bencisotiazolinona (BIT), 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano y 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol.

El intervalo de concentración de la MIT puede variar de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 0,020, de aproximadamente 0,0010 a aproximadamente 0,010 y de aproximadamente 0,0015 a aproximadamente 0,005 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento. El intervalo de concentración de la BIT puede variar de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 0,20, de aproximadamente 0,0010 a aproximadamente 0,10 y de aproximadamente 0,0015 a aproximadamente 0,05 por ciento en peso, basado en el peso de la composición de revestimiento. Los intervalos de concentración de los otros o segundos agentes antimicrobianos se pueden obtener de sus respectivos suministradores, teniendo en cuenta que los agentes se pueden usar en el extremo inferior o incluso por debajo del intervalo de uso sugerido cuando se usan combinados con el agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático. También, los agentes se pueden usar combinados con otro agente y con el agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático como sistema antimicrobiano, para intensificar la eficacia combinada contra una diversidad de microorganismos, porque se sabe que algunos agentes son más eficaces contra tipos específicos de microorganismos, por ejemplo, bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, mohos y/o levadura.

Así, en otra realización, la invención proporciona una composición de revestimiento que comprende:

- (a) un sistema antimicrobiano que comprende por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol y por lo menos un segundo agente antimicrobiano,
- (b) agua, y
- (c) un aglutinante,

en la que el sistema antimicrobiano está presente en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la composición de revestimiento.

- 10 En otra realización, la invención proporciona un método para reducir o inhibir crecimiento microbiano en una composición de revestimiento, que comprende:

añadir un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol a una composición de revestimiento que comprende agua y un aglutinante, en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la composición de revestimiento.

En otra realización, la invención proporciona un método para reducir o inhibir crecimiento microbiano en una composición de revestimiento, que comprende:

añadir un sistema antimicrobiano que comprende por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol y por lo menos un segundo agente antimicrobiano, a una composición de revestimiento que comprende agua y un aglutinante, en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la composición de revestimiento.

La manera en la que el agente antimicrobiano del tipo de diol alifático se añade a la composición de revestimiento no es particularmente limitante. Por ejemplo, el agente antimicrobiano del tipo de diol alifático se puede añadir a la composición de revestimiento simplemente combinándolo con la composición y mezclando los ingredientes. Alternativamente, el agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático, debido a su elevado poder de solubilización, se puede usar como disolvente de uno o más de los ingredientes de la composición de revestimiento antes de mezclarlo con el resto de los ingredientes de la composición.

El propio agente antimicrobiano 1,4-CHDM es un sólido blando a temperatura ambiente. Por lo tanto, para proporcionar el agente antimicrobiano 1,4-CHDM en forma líquida, para facilitar su mezclado y/o manejo, primero se puede diluir con hasta 10% en peso o más de agua antes de combinarlo con la composición de revestimiento o con los ingredientes de ésta.

Esta invención se puede ilustrar más por medio de los siguientes ejemplos de realizaciones preferidas aunque se debe entender que estos ejemplos se incluyen meramente con fines ilustrativos y no limitan el alcance de la invención. Salvo que se indique lo contrario, todos los porcentajes son en peso y son porcentajes basados en el peso total de la composición.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se realizó en una pintura un ensayo de la eficacia antimicrobiana del 1,4-CHDM. Los procedimientos de ensayo se realizaron en general de acuerdo con los de ASTM D2574-06: *Standard Test for Resistance of Emulsion Paints in the Container to Attack by Microorganisms*.

La pintura usada para los ensayos fue una pintura comercial acuosa de látex para paredes planas interiores, comprada de Wal-Mart. El nombre comercial de la pintura es Quik Hide. El color era Blanco Mate 26905. Se compró un bidón de 18,9 litros. El contenido especificado de compuestos orgánicos volátiles (VOC) fue menor que 100 g/l. En la tabla 1 se indican los ingredientes especificados en la etiqueta de la pintura.

Tabla 1. Ingredientes especificados en la etiqueta de la pintura de ensayo

Ingrediente	Número CAS
Agua	7732-18-5
Caolín	22708-90-3

Ingrediente	Número CAS
Carbonato cálcico	1317-65-3
Copolímero de etileno/acetato de vinilo	No disponible
Dióxido de titanio	13463-67-7
Sílice	14464-46-1
Sílice cristalina	14808-60-7

5 Se distribuyeron en tubos estériles de plástico partes alícuotas de pintura no inoculada. El volumen añadido de pintura ajustó de modo que el volumen de aditivos más el volumen de pintura fuera igual a 25 ml. Se prepararon muestras añadiendo individualmente o combinados CHDM-D90 (1,4-CHDM, 90% peso/peso en agua), 1,3-CHDM (100%), BIT (Proxel GXL, 20% de componente activo; Arch), MIT (Acticide M20S, 20% de componente activo; Thor Specialties Inc.), TMCBD (2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol), PG (propilenglicol) y sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), en las cantidades especificadas en la tabla 2, para producir muestras de pintura de ensayo. Los porcentajes indicados en la tabla 2 son porcentajes en peso.

Tabla 2. Aditivos de las muestras de pintura

Ensayo	Descripción
1	Sin aditivos
2	BIT, 0,2%
3	BIT, 0,05%
4	BIT y MIT, 0,2% de cada una
5	BIT y MIT, 0,05% de cada una
6	MIT, 0,2%
7	MIT, 0,05%
8	1,4-CHDM, 5,0%
9	1,4-CHDM, 2,5%
10	1,4-CHDM, 1,25%
11	1,4-CHDM, 0,5%
12	1,3-CHDM, 5,0%
13	1,3-CHDM, 2,5%
14	1,3-CHDM, 1,25%
15	1,3-CHDM, 0,5%
16	TMCBD, 5%
17	TMCBD, 2,5%
18	TMCBD, 1,25%
19	TMCD, 0,5%
20	PG, 5,0%
21	PG, 2,5%
22	PG, 1,25%
23	PG, 0,5%
24	1,4-CHDM, 2,5% + MIT, 0,2%
25	1,4-CHDM, 1,25% + BIT, 0,2%
26	1,4-CHDM, 0,5% + BIT, 0,2%
27	1,4 CHDM, 2,5% + BIT, 0,05%

Ensayo	Descripción
28	1,4-CHDM, 1,25% + BIT, 0,05%
29	1,4-CHDM, 0,5% + BIT, 0,05%
30	1,4-CHDM, 2,5% + BIT/MIT, 0,2% de cada una
31	1,4-CHDM, 1,25% + BIT/MIT, 0,2% de cada una
32	1,4-CHDM, 0,5% + BIT/MIT, 0,2% de cada una
33	1,4-CHDM, 2,5% + BIT/MIT, 0,05% de cada una
34	1,4-CHDM, 1,25% + BIT/MIT, 0,05% de cada una
35	1,4-CHDM, 0,5% + BIT/MIT, 0,05% de cada una
36	1,4-CHDM, 2,5% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,2%
37	1,4-CHDM, 1,25% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,2%
38	1,4-CHDM, 0,5% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,2%
39	1,4-CHDM, 2,5% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,05%
40	1,4-CHDM, 1,25% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,05%
41	1,4-CHDM, 0,5% + EDTA 0,2% + BIT, 0,05%
42	TMCBD, 2,5% + BIT, 0,2%
43	TMCBD, 1,25% + BIT, 0,2%
44	TMCBD, 0,5% + BIT, 0,2%
45	TMCBD, 2,5% + BIT, 0,05%
46	TMCBD, 1,25% + BIT, 0,05%
47	TMCBD, 0,5% + BIT, 0,05%
48	PG, 2,5% + BIT, 0,2%
49	PG, 1,25% + BIT, 0,2%
50	PG, 0,5% + BIT, 0,2%
51	PG, 2,5% + BIT, 0,05%
52	PG, 1,25% + BIT, 0,05%
53	PG, 0,5% + BIT, 0,05%

La concentración de los aditivos en la pintura se ajustó para permitir un volumen final de 28 ml por tubo después de la adición de inóculo. Todos los tubos se mezclaron durante 10 minutos en un agitador oscilante mecánico regulado a 75 sacudidas por minuto y después se dejaron estáticos a temperatura ambiente durante un mínimo de 48 horas.

- 5 Las bacterias (las cinco primeras de la lista), levadura (*C. albicans*) y hongo (*A. niger*) de la tabla 3 se usaron como organismos de estimulación para ensayar la eficacia antimicrobiana de los aditivos contenidos en las muestras de la pintura de ensayo. Cada organismo se aisló de muestras previas contaminadas naturalmente de pintura, látex o adhesivo. En la tabla 3 se da también la concentración de cada organismo [unidades formadoras de colonias/gramo (CFU/g)] en las muestras de las pinturas de ensayo añadidas como inóculo.

Tabla 3. Organismos de estimulación

Organismo	CFU/g
<i>Escherichia coli</i>	$2,8 \times 10^5$
<i>Aeromonas sp.</i>	$2,3 \times 10^5$
Aislado de bacterias reductoras de sulfatos (SRB)	$2,0 \times 10^5$
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,0 \times 10^5$
<i>Proteus vulgaris</i>	$2,3 \times 10^5$

Organismo	CFU/g
<i>Aspergillus niger</i>	$2,1 \times 10^5$
<i>Candida albicans</i>	$1,8 \times 10^5$

Los cultivos bacterianos se realizaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 96 horas en un medio líquido. El aislado de SRB se cultivó en un caldo de tioglicolato. Las otras bacterias y *C. albicans* se cultivaron en un caldo de soja-tripticase con 1% de dextrosa. Los cultivos de *C. albicans* se realizaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 96 horas. *A. niger* se cultivó en el caldo de Sabouraud de agar-dextrosa (SDA) y en el caldo de soja-tripticase con 1% de dextrosa a 22°C durante 7 a 14 días o hasta que se consiguió esporulación completa (en el caso del cultivo de agar). Las esporas del cultivo en placa de *A. niger* se sacaron frotando suavemente el cultivo con un lazo metálico inoculante estéril o retirándolas con un percutor estéril de vidrio. Se añadieron las esporas al caldo de cultivo y después se filtró la mezcla a través de algodón estéril no absorbente y se ajustó a un nivel de esporas de $1,0 \times 10^8$ usando un hemocitómetro.

Los organismos de estimulación se aclimataron inicialmente a la pintura sin aditivos añadiendo a la pintura 10% en volumen de caldo de cultivo individual para dar concentraciones finales de 10^6 – 10^7 CFU/ml de cada cultivo bacteriano y producir cultivos del material de pintura. Los cultivos (o suspensión) de *A. niger* y *C. albicans* se vertieron primero a través de gasa estéril no absorbente para eliminar agregados y después se centrifugaron. Los sólidos se volvieron a suspender a la concentración deseada en la pintura estimando la concentración usando un hemocitómetro. Las muestras se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en el caso de las bacterias y a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en el caso de *A. niger* y *C. albicans*. Las muestras de estos cultivos del material de pintura se colocaron en placas de dilución como se describe más adelante para la verificación de la concentración de organismos e impedir contaminación.

Se añadió a estas muestras preparadas de pintura de ensayo (pintura + aditivos) 3 ml de cada cultivo del material de pintura (diluido si fuera necesario) para producir una concentración teórica total de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^6$ CFU/ml de organismos de estimulación y producir muestras de pintura inoculada. Antes de la dilución, los cultivos del material de pintura con *C. albicans* y *A. niger* se filtraron de nuevo a través de gasa estéril, se centrifugaron para recoger sólidos y se volvieron a suspender como se ha descrito antes. Las diluciones de los cultivos del material de pintura y de las muestras de pintura inoculada se colocaron en placas como se describe más adelante para verificar niveles de estimulación.

Las muestras de pintura inoculada se mantuvieron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 14 días y después a temperatura ambiente durante 14 días. Las muestras de pintura inoculada se inocularon de nuevo el día 5 con los mismos cultivos del material de pintura para dar la misma concentración de organismos que la inoculación del día cero.

Los cultivos del material de pintura y las muestras de pintura inoculada se colocaron en placas de dilución los días 14, 30 y 60 para determinar la concentración de organismos de estimulación viables. Las muestras inoculadas con bacterias, excepto las muestras de SRB, se colocaron en placas de dilución sobre agar de recuento de placas (PCA) y las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en un incubador humidificado. Se subcultivaron *A. niger* y *C. albicans* sobre SDA y se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en un incubador humidificado. Las muestras estimuladas con SRB se ensayaron realizando una serie logarítmica de diluciones de 1:10 a 1:100.000 en un estuche de ensayo disponible comercialmente (BACTI-BOTTLES®; Difco). Los cultivos del material de pintura y las muestras de pintura inoculada se ensayaron con tinción de yodonitrotetrazolio-formazán (INT; tinción vital) y/o con tinción de Gram antes de clasificarlos como negativos. Siempre que se sospechara contaminación, se confirmó la identidad de los microorganismos por tinción de Gram o tinción con Azul Algodón.

Las diluciones en serie para la determinación del recuento en placa de concentraciones de cultivo se realizaron como sigue. Usando una pipeta estéril, se transfirió 1 ml del cultivo de cada muestra de pintura inoculada a tubos de 9 ml con agua destilada estéril y se mezcló intensamente. El proceso se repitió en serie para preparar diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} . Posteriormente, se extendió 0,1 ml de cada muestra o de su dilución sobre tres placas de agar de recuento de placas. Después de más de 48 horas de incubación (a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en el caso de bacterias y a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en el caso de hongos y levadura) en un incubador humidificado, se hizo el recuento de las placas y se anotó con la dilución correspondiente. Si se tuviera que retrasar el recuento, las placas se mantuvieron refrigeradas hasta que se pudiera hacer el recuento.

Los recuentos de las placas se calcularon a partir de diluciones que produjeron entre 22 y 220 recuentos por placa. Los recuentos se expresaron hasta las dos primeras cifras significativas. Si todas las placas tuvieran más colonias bacterianas que las que pudieran ser contadas, los resultados se expresaron como mayor que el límite máximo contable de las placas de dilución con el menor número de colonias. Las concentraciones de células viables de SRB se estimaron determinando la mayor dilución a la que se observó crecimiento positivo (ennegrecimiento) en la BACTI-BOTTLE.

Los resultados se graduaron según la siguiente escala.

ES 2 434 790 T3

Grado	Definición de la graduación en subcultivos de bacterias aerobias y <i>Candida</i>
0	Sin colonias
1	Recuento de 0-51 colonias (10-510 CFU/ml)
2	Recuento de 52-100 colonias (529-1.000 CFU/ml)
3	Recuento de 101-1.000 colonias (1.010-10.000 CFU/ml)
4	Estimación de 1.001-10.000 colonias (10.010-100.000 CFU/ml)
5	Estimación de más de 100.000 colonias (>1.000.000 CFU/ml)

Grado	Definición de la graduación en <i>A. niger</i>
0	Sin colonias (<10 CFU/ml)
1	Recuento de 1-10 colonias (10-100 CFU/ml)
2	Recuento de 11-100 colonias (100-1.000 CFU/ml)
3	Colonias individuales no contables; más del 75% de la placa cubierta con el cultivo
4	No se puede contar en la placa; hay una capa continua de hongos

Grado	Definición de la graduación en subcultivos de SRB
0	Sin crecimiento a ninguna dilución (<10 CFU/ml)
1	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-1} (>10 CFU /ml)
2	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-2} (>100 CFU /ml)
3	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-3} (>1.000 CFU /ml)
4	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-4} (>10.000 CFU /ml)
5	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-5} (>100.000 CFU /ml)

Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 4. En cada ejemplo se hizo la media de los resultados de los ensayos realizados por duplicado.

Tabla 4. Resultados de los ensayos de estimulación

Recuento de las placas (escala 0-5)																																										
Ensayo	E. coli						Aeromonas sp.						Aislado de SRB						B. subtilis						P. Vulgaris						A. Niger						C. Albicans					
	Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día								
	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60									
1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5									
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5	3	3	2	3	1	1	4	3	4	3	2	2	4	3	2	2	2	2									
3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
4	2	0	0	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0									
5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
9	0	0	0	0	0	1.5	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
10	1	0	0	2	1	4	3	4	4	4	4	4	4	1	3.5	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0.5	0	2	0.5	0	2	0.5	0									
11	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
12	1.5	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
13	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
14	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
15	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
17	1	4	4	2.5	1	4	1	0	0	1	0	0	0	2	1	3	1.5	0	0	2	0.5	3	2.5	3	2.5	1	3	2.5	1	3	2.5	1	3									
18	4	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4									
19	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
20	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
21	5	5	5	4	4	4	4.5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
22	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
23	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
24	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
25	0	0	0	0	0	0	4	2	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
26	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4									
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									

Recuento de las placas (escala 0-5)																																										
Ensayo	E. coli						Aeromonas sp.						Aislado de SRB						B. subtilis						P. Vulgaris						A. Niger						C. Albicans					
	Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día			Día								
	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60	14	30	60									
28	2	0	0	2	1	1	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	2	1	0											
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4										
30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
31	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
32	0	0	0	2	0	0	4	4	4	4	4	4	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
33	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
34	0	0	0	0	0	0	4	3	4	4	3	4	4	3	2	0	2	1	0	3	2	1	0	3	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0						
35	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	1	1	1	1							
36	0	0	0	0	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
37	0	0	0	0	0	0	4	3	4	4	3	4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
38	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	2	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0.5					
39	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
40	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0					
41	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	2	3	2	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	0	0	0	0	0	0	0					
42	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0					
43	2	4	4	3	4	3.5	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2.5	3	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4					
44	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4					
45	3	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
46	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	4	3	3.5	4	3	4	4	4	4	4	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
47	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4				
48	4	4	4	4	4	4	5	4	4	4	5	4	4	3	2.5	2	3	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2.5					
49	4	4	4	4	4	4	5	4	4	4	5	4	4	3	4	4	3	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	3						
50	4	4	4	4	4	4	5	4	4	4	5	4	4	3	4	4	2.5	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	3							
51	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4				
52	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
53	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		

Como se ve en la tabla 4, en la pintura hubo crecimiento y/o supervivencia de cada uno de los organismos de estimulación. En presencia de 1,4-CHDM (ensayos 8-11), hubo destrucción significativa o total de cada organismo de estimulación. Hubo una respuesta de dosificación asociada con 1,4-CHDM en cada organismo. El TMCBD destruyó también todos los organismos de estimulación al nivel ensayado más alto (ensayo 16) y mostró una respuesta de dosificación a los cuatro niveles ensayados (ensayos 16-19). Hubo poco beneficio y ninguna respuesta de dosificación observable por adición del isómero 1,3 del CHDM (ensayos 12-15) o de propilenglicol (ensayos 20-23).

La combinación de BIT y 1,4-CHDM mostró respuesta sinérgica (mayor que el aditivo) con respecto a *E. coli*, *Aeromonas sp.*, *B. subtilis* y *C. albicans* porque hubo una eficacia sustancialmente mejorada por la adición de cada aditivo por separado (ensayos 24-29). Igualmente, la combinación de TMCBD y BIT mostró también sinergismo en la represión de *E. coli*, *Aeromonas sp.*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. niger* porque hubo una eficacia sustancialmente mejorada por la adición de cada aditivo por separado (ensayos 42-47). La combinación de BIT/MIT y 1,4-CHDM mostró respuesta sinérgica en la represión de *E. coli*, *Aeromonas sp.*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. niger* porque hubo una eficacia sustancialmente mejorada por la adición de cada aditivo por separado (ensayos 30-35). La combinación de 1,4-CHDM, EDTA y BIT mostró respuesta sinérgica en la represión de *E. coli*, *Aeromonas sp.*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *A. niger* aunque la ausencia de un control con EDTA solo hizo menos segura esta afirmación.

Al contrario que los fuertes efectos aditivos y actividad sinérgica de 1,4-CHDM y TMCBD con BIT, no hubo tales efectos evidentes con la combinación de PG y BIT (ensayos 48-53).

Ejemplo 2

Se realizó un ensayo de la eficacia antimicrobiana del 1,4-CHDM en una dispersión de látex. Los procedimientos del ensayo se realizaron en general de acuerdo con ASTM D2574-06: *Standard Test Method for Resistance of Emulsion Latexes in the Container to Attack by Microorganisms*.

Como sustrato para el ensayo de estimulación microbiana se usó una dispersión de látex acrílico sin agente antimicrobiano, pH 7, viscosidad de 200 cp y 49,8% de contenido de sólidos.

Se distribuyeron partes alícuotas de la dispersión de látex en tubos estériles de plástico. Se ajustó el volumen de látex añadido de modo que el volumen de aditivos más el volumen de látex fuera igual a 25 ml para producir muestras de látex de ensayo. Las muestras de pintura de ensayo se prepararon añadiendo individualmente o combinados CHDM-D90 (1,4-CHDM; 90% peso/peso en agua), 1,3-CHDM (100%), BIT (Proxel GXL, 20% de componente activo; Arch Chemicals), MIT (Acticide M20S, 20% de componente activo; Thor Specialties Inc.), IPBC (n-butilcarbamato de 3-yodo-2-propanilo; Acticide IPS20, 20% de componente activo; Thor Specialties Inc.), PG (propilenglicol) y sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dihidrato, en las cantidades indicadas en la tabla 5.

Tabla 5. Aditivos de las muestras de látex

Ensayo	Aditivo(s)
1	Ninguno
2	1,4-CHDM, 5%
3	1,4-CHDM, 2,5%
4	1,4-CHDM, 1,25%
5	1,4-CHDM, 0,5%
6	PG, 5%
7	PG, 2,5%
8	PG, 1,25%
9	PG, 0,5%
10	1,4-CHDM, 2,5% + EDTA, 0,2%
11	1,4-CHDM, 1,25% + EDTA 0,2%
12	1,4-CHDM, 0,5% + EDTA, 0,2%
13	1,4-CHDM, 2,5% + BIT, 0,2%
14	1,4-CHDM, 1,25% + BIT, 0,2%
15	1,4-CHDM, 0,5% + BIT, 0,2%

ES 2 434 790 T3

Ensayo	Aditivo(s)
16	1,4-CHDM, 2,5% + BIT, 0,05%
17	1,4-CHDM, 1,25% + BIT, 0,05%
18	1,4-CHDM, 0,5% + BIT, 0,05%
19	EDTA, 0,2% + BIT, 0,2%
20	EDTA, 0,2% + BIT, 0,05%
21	1,4-CHDM, 2,5% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,2%
22	1,4-CHDM, 1,25% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,2%
23	1,4-CHDM, 0,5% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,2%
24	1,4-CHDM, 2,5% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,05%
25	1,4-CHDM, 1,25% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,05%
26	1,4-CHDM, 0,05% + EDTA, 0,2% + BIT, 0,05%
27	1,4-CHDM, 5% + BIT/MIT, 0,2% de cada una
28	1,4-CHDM, 2,5% + BIT/MIT, 0,2% de cada una
29	1,4-CHDM, 1,25% + BIT/MIT, 0,2% de cada una
30	1,4-CHDM, 5% + BIT/MIT, 0,05% de cada una
31	1,4-CHDM, 1,15% + BIT/MIT, 0,05% de cada una
32	1,4-CHDM, 0,5% + BIT/MIT, 0,05% de cada una
33	PG, 2,5% + BIT, 0,2%
34	PG, 1,25% + BIT, 0,2%
35	PG, 0,5% + BIT, 0,2%
36	PG, 2,5% + BIT, 0,05%
37	PG, 1,25% + BIT, 0,05%
38	PG, 0,5% + BIT, 0,05%
39	BIT, 0,2%
40	BIT, 0,05%
41	BIT/MIT, 0,2%
42	BIT/MIT, 0,05%
43	MIT, 0,2%
44	MIT, 0,05%
45	EDTA, 0,2%
46	EDTA, 0,05%
47	IPBC, 0,1%
48	1,4-CHDM, 2,5% + IPBC, 0,1%
49	1,4-CHDM, 1,25% + IPBC, 0,1%
50	1,4-CHDM, 0,5% + IPBC, 0,1%

Se ajustó la concentración de los aditivos para permitir un volumen final de 28 ml por tubo después de la adición de los cultivos del material de látex discutidos en el ejemplo 1. Todos los tubos se mezclaron durante 10 minutos en un agitador oscilante mecánico regulado a 75 sacudidas por minuto y después se dejaron estáticos a temperatura ambiente durante un mínimo de 48 horas.

Como organismos de estimulación para ensayar la eficacia antimicrobiana de las muestras de látex de ensayo se usaron bacterias [aislado de bacterias reductoras de sulfatos (SRB), *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*], levadura (*Candida albicans*) y hongos (*Aspergillus niger*) como se indica en la tabla 6. Cada organismo se aisló de muestras previas contaminadas naturalmente de pintura, látex o adhesivo. En la tabla 6 se da también la concentración de cada organismo en las muestras de látex de ensayo añadido como inóculos.

Tabla 6. Organismos de estimulación

Organismo	Concentración (CFU/g)
Aislado de bacterias reductoras de sulfatos (SRB)	$10^5 - 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,73 \times 10^5$
<i>Aspergillus niger</i>	$1,72 \times 10^5$
<i>Candida albicans</i>	$1,77 \times 10^5$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,80 \times 10^5$

Los cultivos bacterianos se realizaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 96 horas en un medio líquido. El aislado de SRB se cultivó en un caldo de tioglicolato. Las otras bacterias y *C. albicans* se cultivaron en un caldo de soja-tripticosa con 1% de dextrosa. Los cultivos de *C. albicans* se realizaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 96 horas. *A. niger* se cultivó en el caldo de Sabouraud de agar-dextrosa y en el caldo de soja-tripticosa con 1% de dextrosa a 22°C durante 7 a 14 días o hasta conseguir esporulación total (en el caso del cultivo de agar). Las esporas del cultivo en placa de *A. niger* se sacaron frotando el cultivo suavemente con un lazo metálico inoculante estéril o retirándolo con un percutor estéril de vidrio. Las esporas se añadieron al cultivo de caldo y después se filtró la mezcla a través de algodón estéril no absorbente y se ajustó a un nivel de esporas de $1,0 \times 10^8$ usando un hemocitómetro.

Los organismos de estimulación se aclimataron inicialmente al látex sin aditivos antimicrobianos añadiendo al látex 10% en volumen de cultivo de caldo individual para dar concentraciones finales de $10^6 - 10^7$ CFU/ml de cada cultivo bacteriano y producir cultivos del material de látex. Los cultivos (o suspensión) de *A. niger* y *C. albicans* se vertieron primero a través de gasa estéril no absorbente para eliminar agregados y después se centrifugaron. Los sólidos se volvieron a suspender a la concentración deseada en el látex estimando la concentración usando un hemocitómetro. Los aislados de *P. aeruginosa* y *C. albicans* se encontraban originalmente como cultivo mixto en un producto contaminado. Se preparó un cultivo del material de látex mixto que contenía *P. aeruginosa* y *C. albicans* añadiendo una porción del producto contaminado al látex sin aditivos antimicrobianos. Las muestras del cultivo del material de látex se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en el caso de las bacterias y a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en el caso de *A. niger* y *C. albicans*. Para determinar la concentración de organismos de estimulación, se colocaron en placas de dilución muestras de los cultivos del material de látex, o en el caso de SRB, se evaluaron usando el método de BACTI-BOTTLE, como se describe más adelante.

Se añadió a las muestras de ensayo de látex 3 ml de cada cultivo del material de látex (diluido si fuera necesario) para producir una concentración teórica total de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^6$ CFU/ml y dar muestras de látex inoculado. Antes de la dilución, los cultivos del material de látex con *C. albicans* y *A. niger* se filtraron de nuevo a través de gasa estéril, se centrifugaron para recoger sólidos y se volvieron a suspender como se ha descrito antes. Las diluciones de los cultivos del material de látex se colocaron en placas como se describe más adelante para verificar niveles de estimulación.

Las muestras de látex inoculado se mantuvieron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 14 días y después a temperatura ambiente durante 14 días. Las muestras se inocularon de nuevo el día 5 con los mismos cultivos del material de látex para dar la misma concentración de organismos que la inoculación del día cero.

Los cultivos del material de látex y las muestras de ensayo de látex se colocaron en placas de dilución los días 7, 14, 30 y 60 para determinar la concentración de organismos de estimulación viables. Las muestras inoculadas con bacterias, excepto las muestras de SRB, se colocaron en placas de dilución sobre PCA y las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en un incubador humidificado. Se subcultivaron *A. niger* y *C. albicans* sobre caldo de Sabouraud de agar-dextrosa y se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en un incubador humidificado. Las muestras estimuladas con SRB se ensayaron realizando una serie logarítmica de diluciones de 1:10 a 1:1.000 en un estuche de ensayo disponible comercialmente (BACTI-BOTTLES®; Difco). Todos los cultivos del material de látex se ensayaron con tinción de yodonitrotetrazolio-formazán (INT; tinción vital) y/o con tinción de Gram antes de clasificarlos como negativos. Siempre que se sospechara contaminación, se confirmó la identidad de los microorganismos por tinción de Gram o tinción con Azul Algodón.

Las diluciones en serie para la determinación del recuento en placa de concentraciones de cultivo se realizaron como sigue. Usando una pipeta estéril, se transfirió 1 ml del cultivo de cada muestra de látex inoculado a tubos de 9 ml con agua destilada estéril y se mezcló intensamente. El proceso se repitió en serie para preparar diluciones de

5 10^{-1} a 10^{-8} . Posteriormente, se extendió 0,1 ml de cada muestra o de su dilución sobre tres placas de agar de recuento de placas. Después de más de 48 horas de incubación (a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en el caso de bacterias y a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ en el caso de hongos y levadura) en un incubador humidificado, se hizo el recuento de las placas y se anotó con la dilución correspondiente. Si se tuviera que retrasar el recuento, las placas se mantuvieron refrigeradas hasta que se pudiera hacer el recuento.

10 Los recuentos de las placas se calcularon a partir de diluciones que produjeron entre 22 y 220 recuentos por placa. Los recuentos se expresaron hasta las dos primeras cifras significativas. Si todas las placas tuvieran más colonias bacterianas que las que pudieran ser contadas, los resultados se expresaron como mayor que el límite máximo contable de las placas de dilución con el menor número de colonias. Las concentraciones de células viables de SRB se estimaron determinando la mayor dilución a la que se observó crecimiento positivo (ennegrecimiento) en la BACTI-BOTTLE.

Los resultados se clasificaron según la siguiente escala.

Grado	Definición de la graduación en subcultivos de bacterias aerobias y <i>Candida</i>
0	Sin colonias
1	Recuento de 0-51 colonias (10-510 CFU/ml)
2	Recuento de 52-100 colonias (520-1.000 CFU/ml)
3	Recuento de 101-1.000 colonias (1.010-10.000 CFU/ml)
4	Estimación de 1.001-10.000 colonias (10.010-100.000 CFU/ml)
5	Estimación de más de 100.000 colonias (>1.000.000 CFU/ml)

Grado	Definición de la graduación en <i>A. niger</i>
0	Sin colonias (<10 CFU/ml)
1	Recuento de 1-10 colonias (10-100 CFU/ml)
2	Recuento de 11-100 colonias (100-1.000 CFU/ml)
3	Colonias individuales no contables; más del 75% de la placa cubierta con el cultivo

Grado	Definición de la graduación en <i>A. niger</i>
0	Sin crecimiento a ninguna dilución (<10 CFU/ml)
1	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-1} (>10 CFU /ml)
2	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-2} (>100 CFU /ml)
3	Crecimiento positivo hasta dilución de 10^{-3} (>1.000 CFU /ml)

15 Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 7. En cada ejemplo se hizo la media de los resultados de los ensayos realizados por duplicado. En la tabla, "ND" significa que no se obtuvieron datos.

Tabla 7 Resultados de los ensayos de estimulación

Recuento de las placas (escala 0-5)																														
Ensayo	Bacterias reductoras de sulfatos						Bacillus Subtilis						Aspergillus Niger						Candida Albicans						Pseudo Aeruginosa + Candida Albicans					
	Días						Días						Días						Días						Días					
	7	14	30	60	7	14	30	60	7	14	30	60	7	14	30	60	7	14	30	60	7	14	30	60	7	14	30	60		
1	ND	3	ND	3	4	4	4	5	4	4	5	5	4	4	4	4,5	4	4	4	4,5	4	4	4	4,5	4	4	4	5		
2	ND	3	ND	3	2,5	1,5	1	0,5	2	2	2	1,5	0,5	0,5	1	1,5	3	3	4	4	3	3	3	1	0	0	0	0		
3	ND	3	ND	3	3	3	1	1	3	3	3,5	1	3	3	4	4	4	4	4	4,5	3	3	3	1	2	0	0	0		
4	ND	3	ND	3	4	4	3,5	3,5	4	5	5	5	4	4	4	4,5	4	4	4	4,5	3	3	3	4	4	0	0	0		
5	ND	3	ND	3	5	4	4	4,5	5	5	5	5	5	4	4	5	4	4	4	5	4	4	4	5	5	0	0	0		
6	ND	3	ND	3	4	5	4	5	4	4	5	5	4	4	4	5	4	4	4	5	4	4	4	5	3	0	0	0		
7	ND	3	ND	3	5	5	4	4	4,5	5	5	5	4	5	4	5	4	4	5	5	4	4	4	4	1,5	0	0	0		
8	ND	3	ND	3	5	5	5	4,5	5	5	5	5	5	5	5	4,5	5	5	4,5	5	5	5	5	4,5	4,5	0	0	0		
9	ND	3	ND	3	5	5	5	4,5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	4,5	0	0	0		
10	ND	3	ND	3	1	1	0,5	0	2,5	2,5	3	1	0	0,5	0,5	0	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
11	ND	3	ND	3	1,5	1	1	0,5	4	3	3	1	3	2,5	2	1	3	2,5	2	1	3	3	3	3	1	0	0	0		
12	ND	3	ND	3	3	2,5	1	0	4	4	3	1	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	1	0	0	0		
13	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
14	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
15	ND	3	ND	3	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
16	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0			
17	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
18	ND	3	ND	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0			
19	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
20	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
21	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
22	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
23	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
24	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
25	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
26	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Recuento de las placas (escala 0-5)																								
Bacterias reductoras de sulfatos					Bacillus Subtilis					Aspergillus Niger					Candida Albicans					Pseudo Aeruginosa + Candida Albicans				
Días					Días					Días					Días					Días				
7	14	30	60		7	14	30	60		7	14	30	60		7	14	30	60		7	14	30	60	
Ensayo																								
27	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	ND	3	ND	3	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	ND	3	ND	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	ND	3	ND	3	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	ND	0	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	ND	0	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	ND	1,5	ND	1,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	ND	3	ND	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	ND	3	ND	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	ND	3	ND	3	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	ND	3	ND	3	1,5	0,5	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	ND	3	ND	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	ND	3	ND	3	2,5	1	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0
45	ND	3	ND	3	3,5	3	1	0	0	4	3,5	3	1	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	2,5
46	ND	3	ND	3	4	4	3	3,5		4	0	3	2	4	4	4	4	5	5	5	4	4	4,5	4,5
47	ND	3	ND	3	5	5	4	5		4	0	3	2	4	4	5	4	5	5	5	5	4,5	5	5
48	ND	3	ND	3	3	2	2	1		3	0	2	1	1	1	2,5	3	5	5	3	3	1,5	3,5	3,5
49	ND	3	ND	3	4	4	4	4		4	0	4	1,5	3	3	4	4	4	4	4	4	3,5	4	4
50	ND	3	ND	3	5	5	5	5		4,5	2	3	2	4	4	4	5	5	5	5	5	4	5	5

Como se ve en la tabla 7, en las muestras de ensayo de látex hubo crecimiento y/o supervivencia de cada uno de los organismos de estimulación. En presencia de 1,4-CHDM (ensayos 2-5), hubo destrucción significativa o total de cada organismo de estimulación, excepto SRB. Hubo una respuesta de dosificación asociada con 1,4-CHDM en cada organismo, excepto SRB. El propilenglicol (ensayos 6-9) a las mismas concentraciones que el 1,4-CHDM mostró cierta capacidad de inhibir o destruir los organismos de estimulación pero, en cada caso, distintos de las SRB, a un grado menor que el 1,4-CHDM. Hubo una eficacia mayor del 1,4-CHDM con la adición de EDTA (ensayos 10-12) en comparación con el 1,4-CHDM o EDTA solos (ensayo 45). Este fue particularmente el caso en la represión de *B. subtilis*, *C. albicans* y de la mezcla de *P. aeruginosa*/*C. albicans*. La BIT y MIT (ensayos 39-44) fueron muy eficaces en la represión de todos los organismos de estimulación con la excepción de SRB. Como hubo poca o ninguna supervivencia de organismos de estimulación en presencia de BIT, MIT o BIT/MIT, no fue posible detectar beneficio alguno por añadir 1,4-CHDM (ensayos 13-32) a estas concentraciones de BIT, MIT y BIT/MIT. Finalmente, no se encontró que el IPBC fuera beneficioso a la concentración ensayada (ensayo 47). La combinación de 1,4-CHDM e IPBC proporcionó poco o ningún beneficio con respecto a la adición de 1,4-CHDM solo (ensayos 48-50).

Ejemplo 3

Comparación de la actividad antimicrobiana del ciclohexano-1,1-dimetanol y ciclohexano-1,4-dimetanol

Se han determinado las actividades antimicrobianas del ciclohexano-1,4-dimetanol (1,4-CHDM) y ciclohexano-1,1-dimetanol (1,1-CHDM). Cada actividad se calculó como concentración inhibidora mínima (MIC), que revela la concentración más baja necesaria para inhibir crecimiento visible. Se calcularon individualmente las MIC durante tres días consecutivos con los dos isómeros de ciclohexano-1,4-dimetanol y con la mezcla de 31% de cis y 69% de trans de ciclohexano-1,4-dimetanol. Se evaluaron los dos compuestos contra un conjunto de cinco cepas de microorganismos. El 1,1-CHDM presentó una eficacia significativamente mejor que el 1,4-CHDM frente a diferentes organismos.

Una actividad antimicrobiana mayor puede permitir concentraciones y volúmenes reducidos de CHDM durante la formulación del revestimiento. Reduciendo la cantidad de CHDM se puede minimizar el impacto sobre las propiedades del revestimiento a formular conservando al mismo tiempo una actividad comparable y también se pueden reducir costes por producir menos material con la misma actividad neta.

Materiales y métodos para el ejemplo 3

Se compraron cepas de *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus* de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Se compraron placas de microvaloración de 96 pocillos de poliestireno y fondo plano de NUNC (número del catálogo NUNC 269787) y tubos de cultivo de 17x100 mm de VWR Internacional, LLC (West Chester, PA). Los compuestos CHDM-D90 y 1,1-CHDM (>99,7% verificado por cromatografía y por resonancia magnética nuclear) los suministró Eastman Chemical Company (Kingsport, TN). Todos los cultivos bacterianos se realizaron en caldo de soja-tripticosa BD BBL y todos los cultivos de hongos se realizaron en caldo de Sabouraud de agar-dextrosa, comprados ambos de VWR Internacional, LLC (West Chester, PA). Las mediciones de absorbancia se realizaron con un lector de microplacas TECAN GENios Pro.

Preparación de inóculo

Se transfirió un lazo metálico pequeño cargado con inóculo desde una placa de agar recién sembrada en estrías de cada cepa a 5 ml de medio estéril en un tubo de cultivo de 17x100 mm. Los tubos se incubaron a la temperatura apropiada sin agitación oscilante y en los medios apropiados relacionados en la tabla 8. Las bacterias se incubaron durante 20-28 horas y *C. albicans* durante 44-52 horas.

En el caso de *A. niger*, el procedimiento fue significativamente diferente. Se cultivó *A. niger* en caldo de Sabouraud de agar-dextrosa hasta que fue visiblemente evidente una concentración alta de esporas negras. Se recogieron las esporas de la placa por suspensión en 3 ml de caldo de Sabouraud de agar-dextrosa utilizando un extensor estéril de plástico y una pipeta estéril de transferencia,

Tabla 8

Microorganismos utilizados para la determinación de la concentración inhibidora mínima

Género y especie	ATCC ID	Temperatura de incubación (°C)	Descripción	Medio de crecimiento
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	27853	30	Bacteria bacilar Gram negativa	Caldo de soja-tripticosa
<i>Candida albicans</i>	10231	25	Hongo diploide	Caldo Sabouraud de dextrosa

Género y especie	ATCC ID	Temperatura de incubación (°C)	Descripción	Medio de crecimiento
<i>Escherichia coli</i>	25922	35	Bacteria bacilar Gram negativa	Caldo de soja-tripticasa
<i>Aspergillus niger</i>	16404	25	Hongo filamentoso	Caldo de Sabouraud de dextrosa
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	35	Bacteria bacilar Gram negativa	Caldo de soja-tripticasa

Dilución de isómeros de CHDM

De cada isómero se prepararon soluciones de material en el correspondiente medio de crecimiento a una concentración de 5% peso/volumen (1,4-CHDM) o 2,25% peso/volumen (1,1-CHDM). Se prepararon diluciones en serie con una relación de dilución de 1:1,3333 de modo que se cubrió un intervalo logarítmico con nueve diluciones.

5 Preparación de placas de 96 pocillos

Se transfirió doscientos microlitros de cada concentración de CHDM a 4 pocillos de una placa estéril de 96 pocillos. En los controles no inoculados de alto nivel se llenaron cuatro pocillos extra de la concentración más alta. Se llenaron cuatro pocillos adicionales con sólo caldo estéril para servir como controles positivos y negativos. Tres de los cuatro pocillos de cada concentración de CHDM se inocularon con una de las cepas relacionadas en la tabla 8. El último pocillo de cada dilución de isómero de CHDM se dejó sin inocular para servir como controles de la turbiedad de fondo asociada con compuestos de ensayo. Las placas con bacterias o con *C. albicans* se inocularon con 2 µl de cultivo de siembra hasta una concentración final de aproximadamente 10⁶ CFU/ml en el caso de las bacterias y de 10⁵ CFU/ml en el caso de *C. albicans*. Las placas con *A. niger* se inocularon con 2 µl de la suspensión de esporas preparadas anteriormente.

15 Determinación de la concentración inhibidora mínima (MIC)

Se cubrió e incubó cada placa a la temperatura apropiada y se midió la turbiedad como medida de la densidad celular por medición de la absorbancia a 612 nm usando un lector de microplacas. Las mediciones se realizaron en cada placa a las 24, 48 y 72 horas. Se pasaron los datos brutos a una hoja de cálculo Excel y se determinaron los valores de la MIC expresándolos como porcentajes en peso. Se obtuvo la absorbancia de cada pocillo inoculado de CHDM restando primero la lectura media de cada pocillo inoculado y después comparando con un umbral positivo para determinar estatus positivo o negativo para el crecimiento. El umbral positivo se calculó multiplicando por 0,05 la absorbancia media de los pocillos inoculados sólo con medio. La MIC se determinó como la concentración de ensayo más baja resultante en los tres pocillos, obtenida por triplicado, que originó valores por debajo del umbral positivo.

25 Resultados

El ciclohexano-1,1-dimetanol presentó un incremento medible de eficacia antimicrobiana con respecto al ciclohexano-1,4-dimetanol. En estos experimentos, la eficacia antimicrobiana se incrementó frente a cuatro de los cinco organismos de ensayo. La solubilidad del 1,1-CHDM estuvo limitada a 2,25% (peso/volumen) en el medio acuoso de crecimiento. Por lo tanto, los resultados de la MIC se limitaron al intervalo de 0-2,25%. Los resultados finales se resumen en la siguiente tabla 9.

Tabla 9

Datos de la concentración inhibidora mínima (MIC)

Comparación de 1,1-CHDM y 1,4-CHDM a las 24, 48 y 72 horas

Organismo	Isómero	MIC		
		Día 1	Día 2	Día 3
<i>P. aeruginosa</i>	1,4-CHDM	1,58	1,58	2,11
	1,1-CHDM	1,26	1,26	1,26
<i>C. albicans</i>	1,4-CHDM	3,75	4,99	>5,0
	1,1-CHDM	2,25	2,25	2,25
<i>E. coli</i>	1,4-CHDM	1,58	1,58	1,58
	1,1-CHDM	1,26	1,26	1,26

Organismo	Isómero	MIC		
		Día 1	Día 2	Día 3
<i>A. niger</i>	1,4-CHDM	>5,0	3,75	3,75
	1,1-CHDM	>2,25	>2,25	>2,25
<i>S. aureus</i>	1,4-CHDM	3,75	3,75	3,75
	1,1-CHDM	2,25	2,25	2,25

Estos resultados muestran que el 1,1-CHDM puede ser un agente antimicrobiano más eficaz que su isómero estructural 1,4-CHDM como se muestra por los valores más bajos de la MIC.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de revestimiento que comprende:

- (a) por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol en una cantidad de 0,1 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento,
- (b) agua, y
- (c) por lo menos un aglutinante.

2. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el citado agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en una cantidad de 0,5 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento.

3. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el citado agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en una cantidad de 1 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento.

4. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el citado aglutinante comprende partículas poliméricas.

5. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en catalizadores, espesantes, estabilizadores, emulsionantes, estructurantes, promotores de la adherencia, estabilizadores UV, aplanadores, agentes de control de la fluidez, extensores, plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes humectantes de pigmentos, agentes dispersantes de pigmentos, agentes desespumantes, agentes antiespumantes, agentes contra la sedimentación, agentes contra el pandeo e inhibidores de la corrosión.

6. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la citada composición de revestimiento se selecciona del grupo que consiste en revestimiento de paredes planas y no planas, imprimación, imprimación plástica, sellador, imprimación por debajo del revestimiento, revestimiento de suelos, revestimiento de tejados, revestimiento antiadherente, compuesto de curado de hormigón, sellador de calzadas, revestimiento seco, revestimiento de acabado de imitación, compuesto de desmoldeo, revestimiento de mantenimiento industrial, laca, revestimiento con estructura de masilla, revestimiento de esmalte, revestimiento antioxidante, sellador de lijado, tintes, revestimientos de piscinas, revestimientos de señales de tráfico, barnices, selladores impermeabilizantes y composiciones protectoras de la madera.

7. Una composición de revestimiento, que comprende:

- (a) por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol, en una cantidad de 0,1 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento,
- (b) agua, y
- (c) por lo menos un aglutinante,

en la que el agente antimicrobiano está presente en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la citada composición de revestimiento y en la que la citada composición de revestimiento se selecciona del grupo que consiste en revestimiento de paredes planas y no planas, imprimación, imprimación plástica, sellador, imprimación por debajo del revestimiento, revestimiento de suelos, revestimiento de tejados, revestimiento antiadherente, compuesto de curado de hormigón, sellador de calzadas, revestimiento seco, revestimiento de acabado de imitación, compuesto de desmoldeo, revestimiento de mantenimiento industrial, laca, revestimiento con estructura de masilla, revestimiento de esmalte, revestimiento antioxidante, sellador de lijado, tintes, revestimientos de piscinas, revestimientos de señales de tráfico, barnices, selladores impermeabilizantes y composiciones protectoras de la madera.

8. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el citado agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en una cantidad de 0,2 a 5 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento.

9. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el citado agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en una cantidad de 0,4 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento.

10. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el citado aglutinante comprende partículas poliméricas.

11. La composición de revestimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en catalizadores, espesantes, estabilizadores, emulsionantes, estructurantes, promotores de la adherencia, estabilizadores UV, aplanadores, agentes de control de la fluidez, extensores, plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes humectantes de pigmentos, agentes dispersantes de pigmentos, agentes desespumantes, agentes antiespumantes, agentes contra la sedimentación, agentes contra el pandeo e inhibidores de la corrosión.

12. Un método para reducir o inhibir crecimiento microbiano en una composición de revestimiento, que comprende:

añadir por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol a una composición de revestimiento que comprende agua y un aglutinante, en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la citada composición de revestimiento.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el citado agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en una cantidad de 0,5 a 5 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el citado agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático está presente en una cantidad de 1 a 3 por ciento en peso, basado en el peso de la citada composición de revestimiento.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el citado aglutinante comprende partículas poliméricas.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la citada composición de revestimiento comprende además uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en catalizadores, espesantes, estabilizadores, emulsionantes, estructurantes, promotores de la adherencia, estabilizadores UV, aplanadores, agentes de control de la fluidez, extensores, plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes humectantes de pigmentos, agentes dispersantes de pigmentos, agentes desespumantes, agentes antiespumantes, agentes contra la sedimentación, agentes contra el pandeo e inhibidores de la corrosión.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la citada composición de revestimiento se selecciona del grupo que consiste en revestimiento de paredes planas y no planas, imprimación, imprimación plástica, sellador, imprimación por debajo del revestimiento, revestimiento de suelos, revestimiento de tejados, revestimiento antiadherente, compuesto de curado de hormigón, sellador de calzadas, revestimiento seco, revestimiento de acabado de imitación, compuesto de desmoldeo, revestimiento de mantenimiento industrial, laca, revestimiento con estructura de masilla, revestimiento de esmalte, revestimiento antioxidante, sellador de lijado, tintes, revestimientos de piscinas, revestimientos de señales de tráfico, barnices, selladores impermeabilizantes y composiciones protectoras de la madera.

18. Un método para reducir o inhibir crecimiento microbiano en una composición de revestimiento, que comprende:

añadir un sistema antimicrobiano que comprende por lo menos un agente antimicrobiano del tipo de diol cicloalifático seleccionado del grupo que consiste en ciclohexano-1,1-dimetanol, ciclohexano-1,2-dimetanol, ciclohexano-1,4-dimetanol y 2,2,4,4-tetrametilciclobutano-1,3-diol y por lo menos un segundo agente antimicrobiano, a una composición de revestimiento que comprende agua y un aglutinante, en una cantidad eficaz para reducir o inhibir crecimiento microbiano en la citada composición de revestimiento.