

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 270**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/10** (2006.01)  
**A01N 43/16** (2006.01)  
**A01P 1/00** (2006.01)  
**A61K 8/368** (2006.01)  
**A61K 8/49** (2006.01)  
**A61Q 5/02** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61L 2/18** (2006.01)  
**C11D 3/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2003 E 11006213 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2387883**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas que comprenden ácido benzoico**

30 Prioridad:

**12.08.2002 US 403004 P**  
**12.08.2002 US 403169 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.04.2014**

73 Titular/es:

**LONZA INC. (100.0%)**  
**90 Boroline Road**  
**Allendale, NJ 07401-1613, US**

72 Inventor/es:

**LUTZ, PATRICK JAY;**  
**BOROKHOV, OLGA y**  
**SHIBU, ABRAHAM**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 455 270 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**

Composiciones antimicrobianas que comprenden ácido benzoico

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a productos para el cuidado personal que comprenden composiciones antimicrobianas y a los métodos de destruir y/o inhibir el crecimiento o los microorganismos.

**10 Antecedentes de la invención**

Los productos naturales, aunque frecuentemente son seguros, son generalmente caros y no tienen eficacia biocida contra un amplio espectro de microorganismos tales como bacterias gramnegativas y grampositivas y hongos. La mayoría de los productos naturales solamente son eficaces contra bacterias grampositivas a concentraciones relativamente altas y no son eficaces contra bacterias gramnegativas u hongos.

Hay una necesidad continua de sistemas conservantes baratos y seguros que sean eficaces contra un amplio espectro de microorganismos.

El documento US 5 683 737 A divulga composiciones de mayonesa y aderezo que tienen un sistema conservante basado en δ-gluconolactona. El documento US 4 011 346 divulga alimentos para mascotas que comprenden agentes bacteriostáticos ácidos, tales como δ-gluconolactona, en combinación con antimicóticos comestibles tales como el ácido benzoico.

El documento US 5 336 500 divulga composiciones desinfectantes sinérgicas que comprenden ácido sórbico y ácido benzoico y un sistema disolvente de alcohol monohídrico y polihídrico. Las composiciones son adecuadas, entre otros, para su incorporación en toallitas para las manos, cremas o jabones.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un producto para el cuidado personal que comprende una composición antimicrobiana que comprende una cantidad efectiva antimicrobiana (tales como una cantidad conservante, bactericida y/o fungicida eficaz) de una mezcla que comprende

- (a) ácido benzoico, o una sal del mismo y
- (b) δ-gluconolactona

y, opcionalmente, uno o más de:

- (c) aceite de citronela;
- (d) cinamaldehído;
- (e) ácido sórbico, o una sal del mismo;
- (f) ácido eritórbico, o una sal del mismo;
- (g) arabinogalactano, (galactoarabinano);
- (h) un-hexahidro-iso-alfa-ácido o tetrahidro-iso-alfa-ácido obtenible a partir de extractos de lúpulo, o una mezcla de los mismos;
- (i) Aceite de *Achillea fragrantissima* (*Santolina fragrantissima* Forssk., santolina).

El producto puede ser sólido o líquido.

Preferiblemente, las mezclas de la presente invención incluyen una cantidad sinérgica eficaz antimicrobiana (por ejemplo, conservante, bactericida y/o fungicida) de los componentes anteriormente mencionados.

Las composiciones antimicrobianas comprendidas en el producto para el cuidado personal de la presente invención incluyen, las mostradas a continuación.

Componente (a)	Componente (b)
ácido benzoico o una sal del mismo (por ejemplo, benzoato de sodio)	glucono delta lactona

En las mezclas anteriormente mencionadas que contienen glucono delta lactona, la glucono delta lactona potencia la eficacia antimicrobiana del conservante (ácido benzoico) en la mezcla.

Otra realización es un método para destruir y/o inhibir el crecimiento de microorganismos sobre un sustrato que es un producto para el cuidado personal mediante la aplicación de una cantidad eficaz de la composición antimicrobiana de la presente invención al sustrato o el producto.

Otra realización más es un método de conservación de un producto (por ejemplo, un producto para el cuidado personal) mediante la incorporación de una cantidad conservante eficaz de la composición antimicrobiana de la presente invención en el producto.

Las formulaciones y productos de la presente invención tienen preferiblemente un pH de menos de 10, 9, 8,5 u 8.

### **Descripción detallada de la invención**

#### 5 Definiciones

El término "microorganismos" incluye, pero no se limita a, bacterias, hongos, levaduras, algas, insectos y plagas.

10 El término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto normal en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, según la práctica de la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta 20 %, preferiblemente hasta 10 %, más preferiblemente hasta 5 % y más preferiblemente aún hasta 1 % de un valor dado. Alternativamente, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el

15 término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente de 5 veces, y más preferiblemente de 2 veces, de un valor. Cuando los valores particulares se describen en la solicitud y las reivindicaciones, salvo que se indique lo contrario, debería asumirse el término "aproximadamente" dentro de un margen de error aceptable para el valor particular.

20 El término "productos para el cuidado personal" se refiere a los productos destinados a su aplicación al cuerpo humano, como la piel, el cabello y las uñas, incluyendo, pero sin limitarse a, champús, acondicionadores, cremas, lociones (como lociones corporales, cosméticos) y jabones.

25 El término "cantidad de olor eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de un agente incorporado en un producto para dar un olor al producto.

El término "potenciar" se refiere a la capacidad de un compuesto o composición para mejorar o aumentar el efecto de un compuesto o composición antimicrobiana. Preferiblemente, la eficacia de la mezcla combinada es mayor que el efecto aditivo de los componentes.

30 Sales adecuadas de ácido sórbico, ácido eritórbico y ácido benzoico incluyen, pero no se limitan a, sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, tales como potasio y sodio.

#### Componentes de las mezclas

35 En la presente invención se puede usar cinamaldehído de cualquier origen. Por ejemplo, el cinamaldehído se puede obtener de extractos de corteza de canela (tales como de la corteza y de la hoja), aceite de hoja de casia, *Cinnamomum cassia*, aceites de canela, cinamal y mezclas de los mismos.

40 Una sal preferida del ácido sórbico es el sorbato de potasio.

Una sal preferida del ácido eritórbico es eritorbato de sodio.

45 Una sal preferida del ácido benzoico es benzoato de sodio.

El arabinogalactano (galactoarabina) se puede obtener de árboles Larex. El arabinogalactano está disponible como Larex UF™ de Larex Inc., de White Bear Lake, MN.

50 Los hexahidro-iso-alfa-ácidos y tetrahidro-iso-alfa-ácidos son los obtenidos a partir de extractos de lúpulo, tales como Hexahop Gold™ (también denominado en la presente memoria como Hexahop) disponibles en John I. Haas, Inc. de Washington, DC.

De acuerdo con una realización específica, la composición antimicrobiana contiene al menos el 0,1 % de ácido sórbico o una sal del mismo, tal como sorbato de potasio.

#### 55 Ejemplos de mezclas preferidas

Sorprendentemente, se ha encontrado que la glucono delta lactona potencia la eficacia biocida del ácido benzoico y las sales del mismo.

60 Las mezclas preferidas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes. También se proporcionan las relaciones de peso preferidas y más preferidas.

Componente (a)	Componente (b)	Relación de peso preferida	Relación de peso más preferida
Glucono delta lactona	Ácido benzoico o una sal del mismo	Aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 20:1	Aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 5:1

Mezclas más preferidas incluyen, pero no se limitan a, las mostradas a continuación.

Componente (a)	Componente (b)	Relación de peso preferida	Relación de peso más preferida
Glucono delta lactona	Benzoato sódico	Aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1	Aproximadamente 3:1

5

### Composiciones antimicrobianas

10 Las composiciones antimicrobianas son útiles como agentes antimicrobianos, fungicidas y bactericidas y como conservantes en los productos para el cuidado personal. La composición antimicrobiana se incorpora en o es un producto para el cuidado personal, tales como champú, acondicionador, crema, loción (tales como loción corporal), cosmético o jabón.

15 El producto contiene una cantidad eficaz antimicrobiana, conservante, bactericida y/o fungicida de la composición antimicrobiana. De acuerdo con una realización, el producto contiene desde aproximadamente el 0,01 hasta aproximadamente el 2,0 % en peso de cada componente de la composición antimicrobiana, basado en el peso total del 100 % del producto. De acuerdo con otra realización, el producto incluye desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 1 o 2 % en peso de la composición antimicrobiana, basado en el peso total del 100 % del producto.

20 Generalmente, la composición y el sistema conservante antimicrobianos de la presente invención actúan rápidamente (por ejemplo, reducen el recuento de microorganismos (por ejemplo, bacterias y/u hongos) en un 95, 99, 99,9 o 99,99 % generalmente en una hora) y mantiene la eficacia (por ejemplo, mantiene menos de 10 ufc/g) durante largos períodos de tiempo (por ejemplo, durante al menos 7, 10, 14 o 28 días). El término "cantidad eficaz conservante" se refiere a una cantidad del sistema conservante que mantiene el número de microorganismos por debajo de 1.000, 100 o 10 ufc/g durante al menos 1, 4, 7, 10, 14 o 28 días.

30 La composición y el sistema conservante antimicrobianos pueden incluir un disolvente, tal como agua y disolventes miscibles en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, propanol, iso-propanol y butanol), glicoles (por ejemplo, glicerina, diglicerina, butilenglicol, butoxidiglicol, propilenglicol y dipropilenglicol), ésteres, éteres, poliéteres y cualquier combinación de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, el disolvente puede comprender agua y uno o más de glicol y/o uno o más de alcohol, tales como glicerina, fenoxietanol, alcohol bencílico o etanol. Un sistema disolvente específico comprende agua y un glicol, tal como glicerina. Un segundo sistema disolvente específico comprende agua y un alcohol, tal como etanol.

35 Otros adyuvantes pueden ser incluidos en la composición antimicrobiana y el sistema conservante tal como es conocido para un experto normal en la técnica. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, conservantes; agentes solubilizantes; agentes quelantes, tales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sales de los mismos y zeolitas; tensioactivos, tales como tensioactivos catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros; antioxidantes, tales como hidroxianisol butilado (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT); óxidos de amina; aminas terciarias; compuestos de zinc; hidrótrofos; compuestos de flúor; sales de magnesio; sales de calcio; ácidos carboxílicos; fosfatos; fosfonatos; donadores de formaldehído; Glycereth-7; miristato de miristilo; glutaraldehídos; biguanidas; productos naturales, tales como geraniol, ácido úsnico y aceites del árbol de té y cualquier combinación de cualquiera de los anteriores. Los conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cloruros de amonio cuaternario; carbonatos de amonio cuaternario; cloruro de benzalconio; compuestos que contienen yodo, tales como carbamato de 3-yodo-2-propinilbutilo (IPBC); hidantoínas, tales como dimetilhidantoína e hidantoínas halogenadas; isotiazolinonas; parabenos, tales como metilparabeno, etilparabeno y propilparabeno; ácido deshidroacético y sus sales; isocil; cloroxilenol; clorhexidina; fenoxietanol, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido benzoico y sales del mismo, tales como benzoato de sodio; clorobutanol, ácido sórbico y sales de los mismos; triclosán; triclocarbán y cualquier combinación de cualquiera de los anteriores.

50 La composición antimicrobiana y el sistema conservante se pueden incorporar en un sistema acuoso o a base de aceite o en una emulsión. Un disolvente adecuado para un sistema a base de aceite es fenoxietanol y/o alcohol bencílico.

55 La composición antimicrobiana puede ser un líquido o un sólido.

Cuando la mezcla sinérgica contiene sólo dos componentes de la lista anterior, la relación en peso entre el primer

componente y el segundo componente generalmente varía desde aproximadamente 0,01:100 hasta aproximadamente 100:0,01, preferiblemente varía desde aproximadamente 0,1:20 hasta aproximadamente 20:0,1 y más preferiblemente varía desde aproximadamente 1:10 hasta aproximadamente 10:1. Cuando la mezcla sinérgica contiene tres componentes, el tercer componente puede estar en cualquier cantidad, pero por lo general la relación en peso entre el tercer componente y cualquiera de los dos primeros componentes es desde aproximadamente 0,01:100 hasta aproximadamente 100:0,01.

Para preparar una formulación que contiene el producto de la presente invención, se prepara generalmente un concentrado de la composición antimicrobiana y el sistema conservante. El concentrado puede incluir desde aproximadamente el 0,01 hasta aproximadamente el 100 % en peso de la composición antimicrobiana y el sistema conservante y contiene preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 80 % en peso de la composición antimicrobiana, basado en el peso total del 100 % del concentrado. Para una composición antimicrobiana de dos componentes, el concentrado contiene ampliamente desde aproximadamente del 0,01 hasta aproximadamente el 99,99 % en peso del primer componente y desde aproximadamente el 99,99 % hasta aproximadamente el 0,01 % en peso del segundo componente (basado en el peso total del 100 % del concentrado).

Antes de su uso, el concentrado se diluye, preferiblemente con el mismo disolvente que se utilizó en el concentrado, y/o se incorpora en un producto. El uso de diluciones de la composición generalmente comprende una cantidad antimicrobiana, conservante, fungicida o bactericida eficaz de la composición antimicrobiana o del sistema conservante.

En general, las diluciones de uso contienen desde aproximadamente el 0,0001 % o el 0,01 % hasta aproximadamente el 2 % en peso del concentrado. De acuerdo con una realización preferida, las diluciones de uso contienen desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 1 % en peso del concentrado. En realizaciones más preferidas, la dilución de uso contiene un 0,2, 0,25 o 0,30 % en peso del concentrado. La dilución de uso contiene generalmente desde aproximadamente el 0,01, hasta aproximadamente el 2,0 % en peso de cada componente antimicrobiano, basado en el peso total del 100 % de la dilución de uso. De acuerdo con una realización preferida, la composición antimicrobiana contiene desde aproximadamente el 0,001 hasta aproximadamente el 10 %, preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 hasta aproximadamente el 1 % y más preferiblemente desde aproximadamente el 0,05 hasta aproximadamente el 0,5 % en peso de cada componente antimicrobiano.

De acuerdo con otra realización, el sistema conservante antes mencionado se incorpora en un producto a una concentración de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 1 o 2 % en peso, basado en el peso total del 100 % de producto.

Otra realización de la presente invención es un método para inhibir el crecimiento de microorganismos, bacterias (por ejemplo, *S. aureus* (ATCC nº 6538), *P. aeruginosa* (ATCC nº 9027) y *E. coli* (ATCC nº 8739)) y/o hongos (incluidos los hongos de plantas y árboles) (por ejemplo, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Phytophthora ramrum*) sobre un sustrato mediante la aplicación de una cantidad antimicrobiana, conservante, bactericida o fungicida eficaz de la composición antimicrobiana o sistema conservante de la presente invención al sustrato. La composición antimicrobiana o el sistema conservante se pueden aplicar al sustrato mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cepillado, inmersión, remojo, impregnación al vacío, y tratamiento a presión.

La composición antimicrobiana de la presente invención se puede preparar mezclando los componentes antimicrobianos y opcionalmente, disolventes y adyuvantes. La mezcla se puede calentar y/o agitar para facilitar el mezclado.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitación. Todas las partes y porcentajes se dan en peso salvo que se indique otra cosa.

### Ejemplo de referencia 1

Cada muestra de champú aniónico de las Figuras 1-3 se ensayó de la siguiente forma. Se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento una solución bacteriana mixta estandarizada. Se incubaron por separado 3 inoculaciones profundas en agar de *S. aureus* (ATCC nº 6538), *P. aeruginosa* (ATCC nº 9027) y *E. coli* (ATCC nº 8739) a aproximadamente 35 °C durante aproximadamente 24 horas. A continuación, cada inoculación se lavó con 3 ml de solución salina estéril al 0,85 %. Los lavados de las 3 inoculaciones se combinaron entre sí para formar una mezcla de organismos. La absorbancia de la mezcla de organismos a 530 nm se ajustó a aproximadamente 1,00 mediante la adición de solución salina. El espectrómetro se calibró con una solución salina blanco. Una alícuota de 5 ml de la mezcla de organismos se mezcló para producir la solución bacteriana mixta estandarizada. A continuación, se inocularon 40 g de cada muestra de champú con 0,2 ml de la solución bacteriana mixta estandarizada y se mezcló. Se añadió 1 g de la mezcla a un tubo de ensayo estéril de 20 × 150 mm con tapón de rosca.

Se añadieron 9 ml de un caldo neutralizador D/E estéril al tubo de ensayo y se mezcló para formar una dilución  $10^{-1}$ . Las diluciones en serie se prepararon mediante una dilución  $10^{-6}$  con agua tamponada con fosfato. Las diluciones en serie se colocaron en placas sobre agar de soja tríptico y se incubaron durante 2 días a aproximadamente 35 °C. Los recuentos de bacterias se realizaron después de 21 días.

5 La composición de champú proteico aniónico estaba comprendida por el 35 % en peso de lauril éter sulfato de sodio; el 25 % en peso de lauril sulfato de trietanolamina; el 3 % en peso de dietanolamida de coco (cocamida DEA); el 1 % en peso de colágeno hidrolizado, disponible como Polypro 5000™ de Hormel Foods de Austin, MN y el 36 % en peso de agua desionizada.

10 La composición antimicrobiana que contiene muestras se preparó mezclando las cantidades apropiadas de los componentes antimicrobianos y la composición de champú de proteico aniónico anteriormente mencionada y calentando la mezcla hasta aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 15 minutos.

15 Ejemplo de referencia 2

Cada muestra de champú aniónico se ensayó de la siguiente forma. Se preparó una solución bacteriana mixta estándar de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se incubaron por separado 2 tubos inclinados de agar de *Candida albicans* y 4 tubos inclinados de agar de *Aspergillus niger* por separado a aproximadamente 25 °C durante aproximadamente 48 horas y 7 días, respectivamente. Cada tubo inclinado de agar se lavó con 3 ml de solución salina estéril al 0,85 %, se recogió y se maceró en un triturador de tejidos. Se añadieron cantidades suficientes de solución salina al 0,85 % a cada tubo inclinado para obtener un recuento visual bajo un microscopio con un hemocitómetro de Neubauer de cada inóculo de *C. albicans* y *A. niger*. Se mezclaron volúmenes iguales de cada inóculo estandarizado de *C. albicans* y *A. niger* para formar la solución fúngica mixta estandarizada.

25 Se inocularon 40 g de cada muestra de champú con 0,4 ml de la solución fúngica mixta estandarizada y se mezcló. Se añadió 1 g de la mezcla a un tubo de ensayo de 20 x 150 mm con tapón de rosca estéril.

30 Se añadieron 9 ml de caldo neutralizador D/E estéril al tubo de ensayo y se mezclaron para formar una dilución  $10^{-1}$ . Las diluciones en serie se prepararon mediante una dilución  $10^{-6}$  con agua tamponada con fosfato. Las diluciones en serie se sembraron en placas sobre agar dextrosa Sabourand y se incubaron 5 días a aproximadamente 25 °C. Los recuentos de hongos se realizaron después de 0, 7 y/o 14 días.

35 La composición de champú proteico aniónico, se describe en el Ejemplo 1. Las muestras de champú se prepararon mezclando las cantidades apropiadas de los componentes antimicrobianos y la composición de champú proteico aniónico y calentando la mezcla a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 15 minutos.

Ejemplo de referencia 3

40 El procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se repitió con las formulaciones de conservantes mostradas en la Tabla 1 siguiente. El pH del champú se ajustó a 6,5. Los resultados se muestran también en la Tabla 1.

Tabla 1

Formulación de conservante	Día 0 ufc/g.	Día 7 ufc/g.	Día 14 ufc/g.	Día 28 ufc/g.
0,3 % p/p de una mezcla que contiene 75 % de sorbato de potasio y 25 % de eritorbato de sodio	$1,3 \times 10^6$	<10	<10	<10
0,3 % p/p de una mezcla que contiene 75 % de benzoato de sodio y 25 % de eritorbato de sodio	$1,3 \times 10^6$	<10	<10	<10
0,45 % p/p de eritorbato de sodio	$1,3 \times 10^6$	$>3 \times 10^6$	$>3 \times 10^6$	$>3 \times 10^6$
0,45 % p/p de benzoato de sodio	$1,3 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$7 \times 10^5$	<10
0,45 % p/p de sorbato de potasio	$1,3 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$6 \times 10^4$	N.D.
Champú sin conservantes	$1,3 \times 10^6$	$>3 \times 10^6$	$>3 \times 10^6$	$>3 \times 10^6$

45 A partir de la Tabla 1, se calculó la sinergia para (1) una dilución al 0,3 % de sorbato de potasio (75 %) y eritorbato de sodio (25 %) y (2) una dilución al 0,3 % de benzoato de sodio (75 %) y eritorbato de sodio (25 %) contra bacterias mezcladas en champú mediante el método descrito en C.E. Kull et al., "Mixtures of Quaternary Ammonium Compounds and Long-chain Fatty Acids as Antifungal Agents", Applied Microbiology, 9:538-541 (1961). Se determinó el valor de sinergia ( $Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$ ).  $Q_A$  es la concentración de sorbato de potasio o benzoato de sodio (en porcentaje en peso) en la mezcla que logró un 100 % de retraso de las bacterias, es decir, un recuento de la placa de <10 ufc después de 7 días.  $Q_a$  es la concentración de sorbato de potasio o benzoato de sodio solo (en porcentaje de peso) requerida para conseguir un 100 % de retraso de las bacterias.  $Q_B$  es la concentración de eritorbato de sodio (en porcentaje en peso) en la mezcla que dio un 100 % de retraso de las bacterias.  $Q_b$  es la concentración de eritorbato de sodio solo (en porcentaje en peso) requerida para dar un 100 % de retraso de las bacterias.

Cuando el valor  $(Q_A/Q_a + Q_B/Q_b)$  es menos de uno, la mezcla es sinérgica. Valores de  $(Q_A/Q_a + Q_B/Q_b)$  de 1 y superiores representan un efecto aditivo y un efecto antagónico, respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2

Mezcla de conservante	Q <sub>A</sub>	Q <sub>B</sub>	Q <sub>a</sub>	Q <sub>b</sub>	$Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$
75 % de sorbato de potasio y 25 % de eritorbato de sodio	0,225 %	0,075 %	0,45 %	0,45 %	0,67 (<1)
75 % de benzoato de sodio y 25 % de eritorbato de sodio	0,225 %	0,075 %	0,45 %	0,45 %	0,67

5

Ejemplo de referencia 4

Cada muestra de champú aniónico de la Tabla 3 siguiente se ensayó de la siguiente forma. Se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento una solución bacteriana mixta estandarizada. Se incubaron por separado 3 inoculaciones profundas en agar de *S. aureus* (ATCC nº 6538), *P. aeruginosa* (ATCC nº 9027) y *E. coli* (ATCC nº 8739) a aproximadamente 35 °C durante aproximadamente 24 horas. A continuación, cada inoculación se lavó con 3 ml de solución salina estéril al 0,85 %. Los lavados de las 3 inoculaciones se combinaron entre sí para formar una mezcla de organismos. La absorbancia de la mezcla de organismos a 530 nm se ajustó a aproximadamente 1,00 mediante la adición de solución salina. El espectrómetro se calibró con una solución salina blanco. Una alícuota de 5 ml de la mezcla de organismos se mezcló para producir la solución bacteriana mixta estandarizada. A continuación, se inocularon 40 g de cada muestra de champú con 0,2 ml de la solución bacteriana mixta estandarizada y se mezcló. Se añadió 1 g de la mezcla a un tubo de ensayo estéril de 20 × 150 mm con tapón de rosca.

10

15

Se añadieron 9 ml de un caldo neutralizador D/E estéril al tubo de ensayo y se mezcló para formar una dilución 10<sup>-1</sup>. Las diluciones en serie se prepararon mediante una dilución 10<sup>-6</sup> con agua tamponada con fosfato. Las diluciones en serie se sembraron en placas sobre agar de soja tríptico y se incubaron durante 2 días a aproximadamente 35 °C. Los recuentos de bacterias se realizaron después de 0, 7 y 14 días. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

20

La composición de champú proteico aniónico estaba comprendida por el 35 % en peso de lauril éter sulfato de sodio; el 25 % en peso de lauril sulfato de trietanolamina; el 3 % en peso de dietanolamida de coco (cocamida DEA); el 1 % en peso de colágeno hidrolizado, disponible como Polypro 5000™ de Hormel Foods de Austin, MN y el 36 % en peso de agua desionizada.

25

El cinamaldehído y otras muestras que contenían conservante se prepararon mezclando las cantidades apropiadas del conservante y la composición de champú proteico aniónico anteriormente mencionada y calentando la mezcla hasta aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 15 minutos.

30

Tabla 3

Champú	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> (ufc/g)		
	Día 0	Día 7	Día 14
Composición de champú proteico aniónico sin conservantes	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
0,25 % Cinamaldehído	3,0 × 10 <sup>7</sup>	<10	<10
0,20 % Cinamaldehído	3,0 × 10 <sup>7</sup>	<10	<10
0,10 % Cinamaldehído	3,0 × 10 <sup>7</sup>	1,0 × 10 <sup>1</sup>	<10
1,0 % Alcohol bencílico	3,0 × 10 <sup>7</sup>	5,0 × 10 <sup>6</sup>	5,3 × 10 <sup>6</sup>
1,0 % LiquaPar Optima*	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	2,0 × 10 <sup>7</sup>
1 % Aceite del árbol de té	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
1 % d-Limoneno	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
1 % Geraniol	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
1 % Nerol	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
1 % Citral	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
1 % Eugenol	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
1 % Hexahop	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>

\* - LiquaPar Optima es fenoxietanol (y) metilparabeno (e) isopropilparabeno (e) isobutilparabeno (y) butilparabeno y está disponible en ISP Labs of Wayne, NJ.

35 Todos los porcentajes de la Tabla 3 son en tanto por ciento en peso basado en el 100 % en peso del champú total.

Ejemplo de referencia 5

Cada muestra de champú aniónico de la Tabla 4 siguiente se ensayó de la siguiente forma. Se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento una solución bacteriana mixta estándar. Se incubaron por separado 2 inoculaciones profundas en agar de *Candida albicans* y 4 tubos inclinados de agar de *Aspergillus niger* a aproximadamente 25 °C

40

durante aproximadamente 48 horas y 7 días, respectivamente. Cada tubo inclinado de agar se lavó con 3 ml de solución salina estéril al 0,85 %, se recogió y se maceró en un triturador de tejidos. Se añadieron cantidades suficientes de solución salina al 0,85 % a cada tubo inclinado para obtener un recuento visual bajo un microscopio con un hemocitómetro de Neubauer de cada inóculo de *C. albicans* y *A. niger*. Se mezclaron volúmenes iguales de cada inóculo estandarizado de *C. albicans* y *A. niger* para formar la solución fúngica mixta estandarizada.

Se inocularon 40 g de cada muestra de champú con 0,4 ml de la solución fúngica mixta estandarizada y se mezcló. Se añadió 1 g de la mezcla a un tubo de ensayo de 20 × 150 mm con tapón de rosca estéril.

Se añadieron 9 ml de caldo neutralizador D/E estéril al tubo de ensayo y se mezclaron para formar una dilución 10<sup>-1</sup>. Las diluciones en serie se prepararon mediante una dilución 10<sup>-6</sup> con agua tamponada con fosfato. Las diluciones en serie se sembraron en placas sobre agar dextrosa Sabourand y se incubaron 5 días a aproximadamente 25 °C. Los recuentos de hongos se realizaron después de 0 y 14 días. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

La composición de champú proteico aniónico, se describe en el Ejemplo 1. Las muestras de champú se prepararon mezclando las cantidades apropiadas de los conservantes y la composición de champú proteico aniónico y calentando la mezcla a aproximadamente 50 °C durante aproximadamente 15 minutos

Tabla 4

Champú	Recuento en placa de hongos (ufc/g)		
	Día 0	Día 7	Día 14
Composición de champú proteico aniónico sin conservantes	1,0 × 10 <sup>5</sup>	4,5 × 10 <sup>4</sup>	8,5 × 10 <sup>4</sup>
0,20 % Cinamaldehído	1,0 × 10 <sup>5</sup>	<10	<10
0,10 % Cinamaldehído	1,0 × 10 <sup>5</sup>	3,0 × 10 <sup>1</sup>	<10
0,05 % Cinamaldehído	1,0 × 10 <sup>5</sup>	8,0 × 10 <sup>3</sup>	<10
1,0 % Alcohol bencílico	1,0 × 10 <sup>5</sup>	6,0 × 10 <sup>3</sup>	6,0 × 10 <sup>4</sup>
1,0 % LiquaPar Optima*	1,0 × 10 <sup>5</sup>	4,0 × 10 <sup>4</sup>	3,0 × 10 <sup>4</sup>

Ejemplo de referencia 6

Cada muestra de crema de la Tabla 5 siguiente se ensayó mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Una crema de gliceril monoestearato (GMS) como la descrita en la Tabla 5 siguiente se preparó de la siguiente forma. Se mezclaron polioxietilen gliceril monoestearato, gliceril monoestearato, alcohol cetearílico y propionato de miristilo y se calentaron hasta 60 °C en un primer recipiente. Se mezclaron glicerina y agua desionizada estéril y se calentaron hasta 60 °C en un segundo recipiente. La solución del primer recipiente se vertió en el segundo recipiente. El segundo recipiente se mantuvo a 60 °C durante 10 minutos. La solución en el segundo recipiente se dejó enfriar. El pH de la solución se ajustó hasta pH 7 con hidróxido sódico para dar la crema de GMS.

Tabla 5

Nombre comercial del componente	Denominación química	Cantidad (% p/p)
Aldisperse <sup>7</sup> MS-20 (Lonza)	Polioxietilen (POE) gliceril monoestearato	4,00
Aldo <sup>7</sup> (Lonza)	Gliceril monoestearato	6,00
TA 1618 (Procter & Gamble)	Alcohol cetearílico	1,50
Lonzest <sup>7</sup> 143-S (Lonza)	Propionato de miristilo	8,00
Glycon <sup>7</sup> G-100 (Lonza)	Glicerina	5,00
-	Agua desionizada estéril	75,50
Total		100,00

Las muestras de crema mostradas en la Tabla 6 siguiente se prepararon mezclando las cantidades apropiadas de los conservantes y la crema GMS y calentando la mezcla hasta 50 °C durante 10-15 minutos. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6

Crema	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> (ufc/g)		
	Día 0	Día 7	Día 14
Crema GMS sin conservantes	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>	3,0 × 10 <sup>7</sup>
0,25 % Cinamaldehído	3,0 × 10 <sup>7</sup>	<10	<10
0,10 % Cinamaldehído	3,0 × 10 <sup>7</sup>	<4,0 × 10 <sup>4</sup>	9,3 × 10 <sup>5</sup>

Las muestras de crema mostradas en la Tabla 7 siguiente se prepararon mezclando las cantidades apropiadas de los conservantes y la crema GMS y calentando la mezcla hasta 50 °C durante 10-15 minutos. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7

Crema	Recuento en placa de hongos (ufc/g)		
	Día 0	Día 7	Día 14
Crema GMS sin conservantes	$1,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
0,25 % Cinamaldehído	$1,0 \times 10^5$	<10	<10
0,10 % Cinamaldehído	$1,0 \times 10^5$	<10	<10

Ejemplo de referencia 7

- 5 El procedimiento del Ejemplo 4 se repitió con las muestras del champú mostradas en la Tabla 8 siguiente. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Crema	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> (ufc/g)		
	Día 0	Día 7	Día 14
Composición de champú proteico aniónico sin conservantes	$3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
0,10 % Cinamaldehído	$3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^1$	<10
0,05 % Cinamaldehído	$3,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
0,05 % Glydant 2000™ *	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
0,02 % Glydant 2000™ y 0,025 % Cinamaldehído	$3,0 \times 10^6$	<10	<10

- 10 \* - Glydant 2000™ es una solución al 70 % de especies de hidantoína incluyendo aproximadamente el 36 % de dimetilol dimetilhidantoína (DMDMH), aproximadamente el 29 % de monometilol dimetilhidantoína (MMDMH) y aproximadamente el 5 % de dimetilhidantoína (DMH) y el 30 % de agua, disponible en Lonza Inc de Fair Lawn, NJ.

- 15 La sinergia de las soluciones de cinamaldehído/Glydant 2000™ de la Tabla 8 frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* se calculó mediante el método descrito en C.E. Kull et al., "Mixtures of Quaternary Ammonium Compounds and Long-chain Fatty Acids as Antifungal Agents", Applied Microbiology, 9:538-541 (1961). Se determinó el valor de sinergia ( $Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$ ) en la Tabla 7.  $Q_A$  es la concentración de cinamaldehído (en porcentaje en peso) en la mezcla que logró un 100 % de retraso de las bacterias, es decir, un recuento de la placa de <10 ufc después de 14 días.  $Q_a$  es la concentración de cinamaldehído solo (en porcentaje de peso) requerida para conseguir un 100 % de retraso de las bacterias.  $Q_B$  es la concentración de Glydant 2000™ (en porcentaje en peso) en la mezcla que dio un 100 % del retraso de las bacterias.  $Q_b$  es la concentración de Glydant 2000™ solo (en porcentaje en peso) requerida para dar un 100 % del retraso de las bacterias.

- 25 Cuando el valor ( $Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$ ) es menos de uno, la mezcla es sinérgica. Valores de ( $Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$ ) de 1 y superiores a 1 representan un efecto aditivo y un efecto antagónico, respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 2 siguiente.

Los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10 siguientes.

- 30

Tabla 9

Para el día 7					
Mezcla de conservante	$Q_A$	$Q_B$	$Q_a$	$Q_b$	$Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$
0,05 % Glydant 2000™	-	-	0,05 %	-	-
0,10 % Cinamaldehído	-	-	-	0,1 %	-
0,02 % Glydant 2000™ y 0,025 % Cinamaldehído	0,02 %	0,025 %	-	-	0,65

Tabla 10

Para el día 14					
Mezcla de conservante	$Q_A$	$Q_B$	$Q_a$	$Q_b$	$Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$
0,05 % Glydant 2000™	-	-	0,05 %	-	-
0,10 % Cinamaldehído	-	-	-	0,05 %	-
0,02 % Glydant 2000™ y 0,025 % Cinamaldehído	0,02 %	0,025 %	-	-	0,90

Ejemplo de referencia 8

- 35

Se ensayó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las mezclas de conservantes. La CIM es la concentración más baja de un componente que va a inhibir el crecimiento de un organismo. Este estudio se llevó a cabo utilizando el sistema de manipulación de líquidos Hamilton Micro Lab AT Plus Autodilutor. Los programas para el aparato de dilución automático se basaron en el Método de aplicación estándar de Lonza SAPM n° 412-01-1. Se utilizó el

Hamilton Autodilutor para diluir las concentraciones de partida de la combinación conservante en un 50 % usando caldo nutritivo en placas de microvaloración de 96 pocillos y también para inocular el microorganismo en las muestras de ensayo.

5 Estos conservantes ensayados fueron Isocil™ (una mezcla de metil isotiazolinona y metil-cloro-isotiazolinona), Benzocil™ (bencisotiazolinona) y Lonzagard™ (cloruro de bencetonio), todos los cuales están disponibles en Lonza Inc. de Fair Lawn, NJ, en diversas concentraciones y combinaciones con cinamaldehído. Los controles también se incluyeron en cada placa de ensayo. Cada combinación conservante se ensayó por duplicado contra

10 *Staphylococcus aureus* (ATCC nº 6538) y *Escherichia coli* (ATCC nº 8739).  
 Las placas de ensayo se diluyeron con el Hamilton Autodilutor y luego se inocularon con el organismo de ensayo para conseguir aproximadamente 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias/gramo de la muestra de ensayo (ufc/g). Las placas se incubaron a continuación en un horno a 32 grados centígrados durante 72 horas. Los resultados se determinaron mediante la comprobación del crecimiento en las muestras de ensayo en comparación con los pocillos de control en cada placa (determinación visual de la turbidez en los pocillos). La CIM mostrada a continuación en la

15 Tabla 11 fue descrita como las concentraciones de ensayo más bajas de conservante o de mezcla conservante que no mostraron ningún crecimiento.  
 Una mezcla de 7,5 ppm (activa) de Benzocil™ y 25 ppm de cinamaldehído inhibieron eficazmente el crecimiento.

20 También, una mezcla de 0,47 ppm (activa) de Isocil™ y 6,3 ppm de cinamaldehído inhibieron eficazmente el crecimiento.

Tabla 11

Material de ensayo	CIM para <i>S. Aureus</i>
Cinamaldehído	125 ppm
Isocil™ (isotiazolinona)	0,585 ppm (activa)
Benzocil™ (Benzoisotiazolinona)	9,375 ppm (activa)

25 Los valores de sinergia para las combinaciones de Isocil™/cinamaldehído y Benzocil™/cinamaldehído se calcularon a partir de los valores de CIM presentados en la Tabla 11 por el método descrito en Kull, *supra*, mencionado anteriormente y se exponen en las Tablas 12 y 13 siguientes.

Tabla 12

Mezcla de conservante	Q <sub>A</sub>	Q <sub>B</sub>	Q <sub>a</sub>	Q <sub>b</sub>	Q <sub>A</sub> /Q <sub>a</sub> + Q <sub>B</sub> /Q <sub>b</sub>
0,585 ppm (activa) Isocil™	-	-	0,585	-	-
125 ppm Cinamaldehído	-	-	-	125	-
0,47 ppm (activa) Isocil™ y 6,3 ppm Cinamaldehído	0,47	6,3	-	-	0,85

30

Tabla 13

Mezcla de conservante	Q <sub>A</sub>	Q <sub>B</sub>	Q <sub>a</sub>	Q <sub>b</sub>	Q <sub>A</sub> /Q <sub>a</sub> + Q <sub>B</sub> /Q <sub>b</sub>
9,375 ppm (activa) Benzocil™	-	-	>9,375	-	-
125 ppm Cinamaldehído	-	-	-	>125	-
7,5 ppm (activa) Benzocil™ y 25 ppm Cinamaldehído	7,5	25	-	-	<1,0

**REIVINDICACIONES**

1. Un producto para el cuidado personal que comprende una composición antimicrobiana que comprende una cantidad antimicrobiana efectiva de una mezcla que comprende:
- 5 (a) ácido benzoico, o una sal del mismo y  
(b)  $\delta$ -gluconolactona
- y, opcionalmente, uno o más de:
- 10 (c) aceite de citronela;  
(d) cinamaldehído;  
(e) ácido sórbico, o una sal del mismo;  
(f) ácido eritórbico, o una sal del mismo;
- 15 (g) arabinogalactano, (galactoarabinano);  
(h) un hexahidro-iso-alfa-ácido o tetrahidro-iso-alfa-ácido obtenible a partir de extractos de lúpulo, o una mezcla de los mismos;  
(i) Aceite de *Achillea fragrantissima* (*Santolina fragrantissima* Forssk., santolina).
- 20 2. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 1, en el que la sal del ácido benzoico es benzoato de sodio.
3. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 2, en el que la relación en peso entre la  $\delta$ -gluconolactona y el benzoato de sodio es de 1:1 a 5:1, preferiblemente de 3:1.
- 25 4. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 1, en el que la composición antimicrobiana comprende además un disolvente.
5. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 4, en el que el disolvente se selecciona de agua, glicoles, alcoholes y mezclas de los mismos.
- 30 6. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 5, en el que el disolvente es una mezcla de agua y un glicol.
- 35 7. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 6, en el que el glicol es glicerina.
8. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 5, en el que el disolvente es una mezcla de agua y un alcohol.
- 40 9. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 8, en el que el alcohol es etanol.
10. El producto para el cuidado personal de la reivindicación 1, en el que la composición antimicrobiana está presente a una concentración del 0,1 al 2 % en peso, basado en el 100 % en peso del producto total.
- 45 11. Un método para destruir y/o inhibir el crecimiento de microorganismos sobre un sustrato, que comprende aplicar al sustrato una cantidad eficaz de la composición antimicrobiana de la reivindicación 1, siendo dicho sustrato un producto para el cuidado personal.
- 50 12. El método de la reivindicación 11, en el que los microorganismos se seleccionan de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Phytophthora ramorum*.