

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 867**

51 Int. Cl.:

**A01N 25/00** (2006.01)

**A61K 8/19** (2006.01)

**A61K 8/29** (2006.01)

**A61K 8/58** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2006 E 06807226 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2079302**

54 Título: **Uso de una composición con propiedades antimicrobianas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.08.2014**

73 Titular/es:

**NM TECH NANOMATERIALS MICRODEVICE  
TECHNOLOGY, LTD. (100.0%)  
NEW ZEALAND HOUSE 80 HAYMARKET  
LONDON SW1Y 4TQ, GB**

72 Inventor/es:

**BIGNOZZI, CARLO ALBERTO y  
DISSETTE, VALERIA**

74 Agente/Representante:

**GALLEGO JIMÉNEZ, José Fernando**

**ES 2 486 867 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

Uso de una composición con propiedades antimicrobianas

La invención se refiere a una composición de nanomaterial que tiene propiedades antibacterianas, antimicrobianas, antivirales, antimicóticas, germicidas, foto-curativas.

5 Además, la invención se refiere a un producto de uso tópico que tiene propiedades antibacterianas, antimicrobianas, antivirales, antimicóticas, germicidas.

Algunas enfermedades, principalmente enfermedades cutáneas, están muy extendidas y, aunque no son fatales, dichas enfermedades resultan desagradables para las personas que las padecen.

10 Por ejemplo, el acné está muy extendido, principalmente entre adolescentes, y los adolescentes afectados por el acné se sienten con frecuencia muy incómodos y tienen problemas al relacionarse con otras personas.

Además, es muy difícil tratar el acné para eliminar las pústulas de la piel de una persona afectada por el acné y sobretodo eliminar las pústulas sin dejar ninguna cicatriz.

15 Los productos conocidos no son muy eficaces, y las pústulas provocadas por el acné permanecen en la piel de la persona afectada durante un periodo de tiempo prolongado, pudiendo extenderse además el contagio del acné a otras zonas de la piel no afectadas previamente por el acné.

Además, los productos conocidos no permiten evitar las cicatrices debidas al acné.

Dichas cicatrices son antiestéticas, además, las cicatrices están situadas principalmente en la piel de la cara y, por lo tanto, no es posible ocultarlas con ropa o pañuelos y deben ser tratadas térmicamente para ser eliminadas.

Por lo tanto, dichas cicatrices provocan muchos problemas, principalmente en relaciones con otras personas.

20 Con frecuencia, los productos conocidos resultan ineficaces para tratar una enfermedad de este tipo y/o requieren de un tiempo de aplicación muy prolongado para mostrar los primeros resultados al tratar la afección en la piel y/o son demasiado agresivos con la piel del paciente.

Además, con frecuencia, en la piel afectada se producen infecciones debido a los microbios externos.

25 Por lo tanto, surge la necesidad de dar a conocer un nuevo producto de uso tópico que es eficaz en el tratamiento de la afección cutánea mencionada anteriormente y que, por otro lado, tiene una buena tolerancia cutánea, y que permite formar una barrera eficaz contra microbios externos, evitando de este modo cualquier infección en la piel afectada.

30 US 2005/0249760 A1 describe un gel protector y reparador lubricante con afinidad con el cuerpo humano que se produce combinando partículas de un fotocatalizador ( $\text{TiO}_2$ ) con un material desinfectante, tal como nano-plata, para producir un compuesto de  $\text{TiO}_2\text{Ag}$ . Este último se mezcla con un organismo biológico natural filtrado con un peso molecular inferior a 50 Kbp y una concentración de 0,05-5%. Se añaden moléculas pequeñas de colágeno, quitina, quitosano, ácido hialurónico, vitamina C y nano-hierro. El valor de pH se ajusta a 6, que es cercano al valor de pH de nuestra piel y, por lo tanto, la mezcla constituye un gel con afinidad con la piel humana y no tóxico para las células humanas. Se añade un ingrediente accesorio, tal como un agente aromático, un detergente o un agente cosmético, en el proceso de fabricación para producir una emulsión o una pasta, que se usa como artículo de salud o sanitario, tal como un jabón líquido para las manos, un cosmético, un champú o un desinfectante (p. ej., contra el acné y las espinillas).

Un objetivo de la invención consiste en dar a conocer medios de tratamiento tópico para tratar enfermedades de acné.

40 Según la invención, se da a conocer el uso de una composición según la reivindicación 1 para obtener un producto de tratamiento tópico para tratar enfermedades de acné.

45  $\text{AO}_x$  es un óxido metálico o metaloide, en el que x indica el número de átomos (O) de oxígeno ligados al átomo metálico (A), siendo  $\text{Me}^{n+}$   $\text{Ag}^+$ , siendo L ácido 4-mercaptofenilborónico y siendo i el número de grupos ( $\text{L-Me}^{n+}$ ) ligados al óxido metálico  $\text{AO}_x$ , dependiendo el valor del parámetro i de varios factores, tal como el tamaño de la nanopartícula de  $\text{AO}_x$  o la naturaleza de la molécula L.

Mediante la elección adecuada de los compuestos en la composición con la fórmula general  $\text{AO}_x\text{-(L-Me}^{n+})_i$ , es posible obtener productos de tratamiento tópico eficaces contra numerosas enfermedades diferentes, además, es posible obtener productos de tratamiento tópico que tienen elementos antivirales, antibacterianos, antimicrobianos, antimicóticos.

50 Preferiblemente, la composición que tiene la fórmula general  $\text{AO}_x\text{-(L-Me}^{n+})_i$  comprende además sales de amonio

cuaternario para mejorar las propiedades antivirales, antibacterianas, antimicrobianas y antimicóticas de los medios de tratamiento tópico.

5 La composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  puede añadirse a cualquier producto de tratamiento tópico conocido para obtener de este modo productos de tratamiento tópico, por ejemplo, en forma de crema o gel o polvo, medios con propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales, antimicrobianas.

Por ejemplo, es posible añadir una composición de este tipo a una crema común de día o de noche o a una crema hidratante, transmitiendo de este modo las propiedades mencionadas anteriormente a la misma.

Gracias a la invención, es posible obtener productos de tratamiento tópico que tienen propiedades antivirales, antibacterianas, antimicrobianas y antimicóticas, además de otras propiedades curativas.

10 Por lo tanto, es posible obtener productos de tratamiento tópico muy eficaces.

De hecho, las propiedades antivirales, antibacterianas, antimicrobianas y antimicóticas permiten mejorar las propiedades curativas de los productos de tratamiento tópico, ya que se evita cualquier crecimiento de proliferación microbiana y también se evita cualquier extensión de contagio a diferentes zonas de la piel, evitándose asimismo cualquier contagio externo.

15 Por lo tanto, se evita cualquier infección de la piel y el proceso curativo es más eficaz y rápido que lo habitual.

Preferiblemente, el producto de tratamiento tópico comprende medios de crema, medios de gel y/o medios de polvo.

20 Además, mediante la selección adecuada de los elementos de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , es posible obtener un producto compatible y, por lo tanto, que puede mezclarse con cualquier forma física de los medios de crema, por ejemplo, emulsiones, geles, suspensiones, espumas, micro-gotas, microesferas, gránulos, microgránulos, emulsiones múltiples, p. ej., emulsiones de agua-en aceite-en agua.

Gracias a la composición y las dimensiones de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , también es posible obtener productos de tratamiento tópico muy homogéneos.

Además, el hecho de añadir la composición con la forma general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  no requiere otra etapa adicional o precauciones específicas en los procesos conocidos para preparar productos de tratamiento tópico.

25 Por lo tanto, simplemente realizar la fase adicional de añadir la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  permite modificar los procesos conocidos para producir productos de tratamiento tópico a efectos de producir productos de tratamiento tópico que tienen propiedades antibacterianas, antimicrobianas, antimicóticas, antivirales.

30 En la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ ,  $AO_x$  puede ser, por ejemplo, dióxido de titanio ( $TiO_2$ ), óxido de zinc ( $ZnO$ ), óxido de estaño ( $SnO_2$ ), óxido de zirconio ( $ZrO_2$ ) y sílice coloidal ( $SiO_2$ );  $Me^{n+}$  puede ser, por ejemplo, un ion metálico de transición, por ejemplo,  $Ag^+$   $Cu^{++}$ .

L es ácido 4-mercaptofenilborónico.

El ion  $Me^{n+}$  es  $Ag^+$  con actividad antibacteriana, antimicótica, antiviral.

En otra realización, el óxido metálico  $AO_x$  comprende  $TiO_2$ , preferiblemente con titanio en forma de anatasa, de modo que es posible obtener una composición anticontaminante, fotocatalítica.

35 Una composición de este tipo tiene un tamaño de partícula inferior a 30 nm, más preferiblemente, inferior a 15 nm.

En una versión, es posible añadir sales de amonio cuaternario a la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , mejorando de este modo las propiedades antivirales, antibacterianas, antimicrobianas y antimicóticas de la composición.

40 Las sales de amonio cuaternario son iones poliatómicos cargados positivamente de la estructura  $NR_4^+X^-$ , siendo R1, R2, R3, R4 grupos de alquil y siendo  $X^-$  un anión adecuado, por ejemplo, un anión de cloruro  $Cl^-$ . Cualquiera o la totalidad de los grupos R puede ser el mismo grupo de alquil o grupos diferentes.

Muchas de las sales de amonio cuaternario se usan ampliamente, por ejemplo, sales de cloruro de amonio.

Las sales de amonio cuaternario se usan, por ejemplo, como desinfectantes, tensioactivos, suavizantes de tejidos, agentes antiestáticos (p. ej., en champú).

45 Mediante la incorporación de sales de amonio cuaternario en la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  es posible mejorar la estabilidad de las suspensiones o emulsiones o soluciones de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , y también mejorar sus propiedades, aumentando las propiedades antivirales, antibacterianas, antimicrobianas y fungicidas.

Además, mediante la selección adecuada de las sales de amonio cuaternario también es posible mejorar las propiedades limpiadoras de un producto detergente.

Por ejemplo, es posible añadir sal de tetraalquilamonio y/o sales de alquilamonio y/o cloruro de benzalconio a la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ .

- 5 Con una composición de este tipo es posible conseguir suspensiones transparentes y suspensiones lechosas, tal como una composición disuelta en disolventes acuosos y en disolventes polares y en disolventes orgánicos y disolventes inorgánicos.

Con una composición de este tipo es posible obtener emulsiones, tal como emulsiones cremosas.

- 10 Estudios han demostrado que una formulación que comprende un producto con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  es eficaz contra diferentes microorganismos, tal como, por ejemplo, bacterias, hongos, esponjas, mohos, y también para eliminar contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Por ejemplo, se ha demostrado su eficacia contra *HSV-1 (virus del herpes simple-1)*, *Adenovirus*, *Poliovirus*, *Aviaria virus*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Salmonella enteritidis D1*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

- 15 Por lo tanto, es posible obtener medios de tratamiento tópico eficaces en la eliminación de tales microorganismos y para evitar la proliferación adicional de los mismos.

Es posible mejorar la comprensión y la implementación de la invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos y figuras adjuntas, en las que:

la Figura 1 muestra esquemáticamente la estructura de una composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ ;

- 20 la Figura 2 es una representación esquemática de una composición específica que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ .

Haciendo referencia a la Figura 1, se muestra esquemáticamente la estructura de una composición que tiene la fórmula general o molecular  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ .

- 25  $AO_x$  es un óxido metálico o metaloide, en el que x indica el número de átomos (O) de oxígeno ligados al átomo metálico (A),  $AO_x$  puede ser, por ejemplo, dióxido de titanio ( $TiO_2$ ), óxido de zinc ( $ZnO$ ), óxido de estaño ( $SnO_2$ ), dióxido de zirconio ( $ZrO_2$ ) y sílice coloidal ( $SiO_2$ ).

$Me^{n+}$  es un ion metálico que tiene actividad antibacteriana, antiviral y antimicótica, por ejemplo,  $Ag^+$ ,  $Cu^{++}$ .

- 30 L es una molécula bifuncional que podría ligarse al óxido metálico u óxido metaloide ( $AO_x$ ) y al ion metálico ( $Me^{n+}$ ), e i es el número de grupos ( $L-Me^{n+}$ ) ligados al óxido metálico  $AO_x$ ; dependiendo el valor del parámetro i de varios factores, tal como el tamaño de la nanopartícula de  $AO_x$ , o la naturaleza de la molécula L.

Tal composición puede mezclarse con tensioactivos catiónicos, tal como sales de alquilamonio o cloruro de benzalconio, que también mejorarán la actividad bactericida de la composición.

- 35 En la Figura 2 se muestra un ejemplo de composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , en la que el óxido metálico  $AO_x$  es  $TiO_2$ , el ion  $Me^+$ , es  $Ag^+$  y el ligando L es una molécula metalorgánica con la fórmula general  $Ru(H_2dcb)_2(NCS)_2$ , donde  $(H_2dcb)_2$ , ácido 2,2-dipiridil-4,4-dicarboxílico es el primer grupo funcional del ligando L y  $(NCS)_2$  es el segundo grupo funcional, y el primer y el segundo grupos funcionales están coordinados por un átomo metálico M de rutenio (Ru).

- 40 Tal como puede observarse en la Figura 1, varias moléculas del ligando L, conjuntamente con varios iones metálicos  $Me^+$ , están ligados al óxido metálico  $AO_x$  y están dispuestos para que la práctica totalidad de la superficie del óxido metálico  $AO_x$  esté cubierta por el ligando L y, por lo tanto, por iones  $Me^+$ .

Esto se debe a las pequeñas dimensiones del ligando L y del ion metálico  $Me^+$ , que pueden ser del orden de picómetros, de modo que cada molécula de óxido metálico  $AO_x$  puede quedar cubierta de forma homogénea por el ion metálico  $Me^+$ .

- 45 Además, gracias a las muy pequeñas dimensiones de las moléculas contenidas en la composición  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , se obtienen nanopartículas que pueden añadirse a un material y mezclarse íntimamente con el mismo, obteniéndose un material, por ejemplo, plástico, con propiedades homogéneas.

Por el mismo motivo, es posible obtener emulsiones o suspensiones muy homogéneas en muchos disolventes diferentes con la composición  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ .

- 50 Una composición de este tipo puede extenderse o aplicarse en una superficie, permitiendo obtener una cobertura y/o

un recubrimiento muy homogéneos de la superficie.

Composiciones con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  tienen un tamaño de partícula inferior a 40 nm, preferiblemente inferior a 30 nm, más preferiblemente inferior a 15 nm.

5 Por lo tanto, es posible obtener películas muy delgadas y homogéneas que cubren de forma homogénea una superficie.

Es posible usar una composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  para obtener suspensiones transparentes y lechosas, en disolventes acuosos y polares, en disolventes inorgánicos y orgánicos, siendo dicha suspensión estable con el paso del tiempo.

10 Para obtener una suspensión de la composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  se mezcla un óxido metálico o metaloide  $AO_x$  con un ligando L y con una solución en la que se disuelven los iones  $Me^{n+}$ .

Los óxidos  $AO_x$  se comercializan normalmente como una suspensión, por ejemplo, suspensiones coloidales, o también en forma de polvo.

Se comercializan suspensiones coloidales basadas, por ejemplo, en sílice coloidal y/o dióxido de estaño.

15 También es posible preparar una suspensión basada en dióxido de titanio y/o dióxido de zirconio, por ejemplo, tal como se explica a continuación.

La suspensión mencionada anteriormente puede ser transparente u opaca, o lechosa, y afectará las propiedades de color de la suspensión final preparada.

20 La suspensión del óxido metálico o metaloide  $AO_x$  se mezcla de forma adecuada con un ligando L adecuado, de modo que es posible absorber un número determinado de moléculas del ligando en la superficie de una molécula de óxido  $AO_x$ , tal como puede observarse en la Figura 1 y tal como se explica en los siguientes ejemplos.

El número de moléculas L absorbidas por una molécula del óxido  $AO_x$  depende del óxido  $AO_x$  específico utilizado.

A continuación se mezcla una solución alcohólica que contiene los iones  $Me^{n+}$  de un metal adecuado, de modo que los iones metálicos pueden ser absorbidos por la molécula L, tal como puede observarse en la Figura 1.

25 La absorción del ligando L en la molécula del óxido  $AO_x$  requiere aproximadamente 12-36 horas, mientras que la absorción de los iones metálicos  $Me^{n+}$  es una reacción sustancialmente instantánea.

Posteriormente se obtienen suspensiones estables en las que el ligando L está ligado al óxido  $AO_x$  y a los iones metálicos  $Me^{n+}$ , siendo posible usar dichas suspensiones para obtener muchos productos diferentes, por ejemplo, los productos mencionados anteriormente y en los usos especificados anteriormente.

30 En otros casos, es posible añadir óxido  $AO_x$  en forma de polvo a una solución que contiene el ligando L y, por lo tanto, es posible añadir una solución alcohólica de iones metálicos  $Me^{n+}$ .

En otros casos, es posible absorber tensioactivos catiónicos en un óxido  $AO_x$  y, por lo tanto, es posible añadir y mezclar un ligando L, preferiblemente en suspensión y/o en solución, e iones metálicos  $Me^{n+}$ , preferiblemente en una solución alcohólica, para que puedan producirse las reacciones de absorción.

35 La presencia de tensioactivos catiónicos permite mejorar la absorción del ligando L en el óxido  $AO_x$  y también la absorción de los iones metálicos  $Me^{n+}$  en el ligando L.

Los tensioactivos catiónicos también permiten mejorar la solubilidad de los componentes en las suspensiones, mejorando su estabilidad, y también mejorar las propiedades antibacterianas, antimicóticas, antimicrobianas de las suspensiones obtenidas.

40 Una vez se ha obtenido la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  en cualquier forma deseada, tal como suspensión, emulsión, solución, es posible añadir dicha composición a los ingredientes para preparar productos de tratamiento tópico, por ejemplo, una crema, una crema de noche, una crema o gel lenitivo, una crema o gel hidratante, obteniéndose un producto de tratamiento tópico con propiedades curativas.

45 También es posible añadir una composición de este tipo a los ingredientes para preparar productos de tratamiento tópico curativos, mejorando sus propiedades curativas y transmitiendo al producto de tratamiento tópico curativo propiedades antimicrobianas, antibacterianas, antimicóticas, antivirales.

#### **Ejemplo 1 Suspensiones transparentes basadas en $TiO_2$**

Se vierten en un vaso de precipitados 300 ml de  $H_2O$  destilada y 2,1 ml de un ácido fuerte, p. ej.,  $HNO_3$  concentrado (65% en peso). Durante un periodo de tiempo de 10 minutos se añaden 50 ml de isopropóxido de titanio

(comercializado por Fluka) con agitación, mediante un embudo de adición.

Se forma un precipitado lechoso blanco de  $\text{TiO}_2$ .

La mezcla se calienta a continuación a 80 °C durante 8 a 12 horas, preocupándose de mantener la agitación y la temperatura constante.

- 5 Durante el calentamiento el precipitado se disuelve nuevamente y la mezcla adquiere un aspecto opalescente.

Durante la fase de calentamiento, la suspensión coloidal se concentra hasta un volumen final de 100 a 200 ml, que se corresponde con una concentración de  $\text{TiO}_2$  de 150-75 g/L.

Las nanopartículas de dióxido de titanio obtenidas al final del proceso tienen un diámetro en el intervalo de 6 a 15 nm.

- 10 La suspensión concentrada a 100 ml se diluye a continuación mediante la adición de agua destilada y etanol para obtener una solución transparente final ( $\text{pH} \approx 2$ ) que tiene una concentración de  $\text{TiO}_2$  del 1,5% y un porcentaje de alcohol comprendido entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50%, preferiblemente aproximadamente del 25%.

### **Ejemplo 2 Suspensiones transparentes basadas en $\text{ZrO}_2$**

- 15 Se vierten en un vaso de precipitados 300 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y 2,1 ml de un ácido fuerte, p. ej.,  $\text{HNO}_3$  concentrado (65%).

Durante un periodo de tiempo de 10 minutos se añaden 76 ml de tetraisopropóxido de zirconio (70% de isopropanol) con agitación, mediante un embudo de adición.

Se observa la formación de un precipitado lechoso blanco de  $\text{ZrO}_2$  de forma casi inmediata.

- 20 La mezcla se calienta a continuación a 90 °C durante 8 a 12 horas, preocupándose de mantener la agitación y de mantener la temperatura constante.

Durante el calentamiento el precipitado se disuelve nuevamente, creándose una suspensión con un aspecto lechoso, concentrada a 140-280 ml, que se corresponde con una concentración de  $\text{ZrO}_2$  de 150-75 g/l.

- 25 La suspensión concentrada a 140 ml se diluye con agua destilada y etanol para obtener 1,4 L de una suspensión opalescente ( $\text{pH} \approx 2$ ) que tiene una concentración de  $\text{ZrO}_2$  del 1,5% y un porcentaje de alcohol comprendido entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50%, preferiblemente aproximadamente del 25%.

### **Ejemplo 3 Suspensiones opacas basadas en $\text{TiO}_2$**

Es posible obtener suspensiones opacas acuosas neutras basadas en dióxido de titanio añadiendo dióxido de titanio P25 a soluciones acuosas de "Triton X 100" (comercializadas por Fluka).

- 30 También es posible preparar suspensiones opalescentes acuosas neutras basadas en dióxido de titanio a partir de ácido peroxitánico mediante la modificación de un procedimiento al que se hace referencia en la literatura (Ichinose, H., Terasaki, M. y Katsuki, H., 1996 J. Ceramic Soc. Japón, 104, 715).

En una preparación típica, se vierten 150 ml de  $\text{TiCl}_4$  con el 20% de HCl en un vaso de precipitados de 1 L, y se añaden a esta solución 826 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluidos según una relación 1:9 con agua destilada.

- 35 El pH de la solución resultante es neutro ( $\text{pH} = 7$ ), y se produce la precipitación de ácido titánico  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ .

Este precipitado es blanco y tiene la consistencia de un gel. El precipitado se recoge en un filtro con una porosidad G3 y se enjuaga con 750-1000 ml de agua destilada (hasta que se consigue la eliminación completa del cloruro, tal como se demuestra tratando el componente filtrado líquido con  $\text{AgNO}_3$ ).

- 40 El precipitado, que comprende ácido titánico  $\text{Ti}(\text{OH})_4$ , queda recogido y suspendido en 200 ml de agua destilada con una conductividad inferior a 1,5 ms y con un pH comprendido en el intervalo 5-7; añadiéndose al mismo lentamente y durante un periodo de 20-30 minutos 92 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%.

Se anota la disolución del precipitado, y la formación de una solución de color amarillo que contiene ácido peroxitánico, con una fórmula general  $[\text{Ti}_2(\text{O})_5(\text{OH})_x]^{(x-2)-}$ , donde x está en el intervalo 3-6.

- 45 Finalmente, la solución se calienta 1 hora a 70 °C para descomponer el exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tratándose en una autoclave 8 horas a 120 °C.

En esta fase del procedimiento, el ácido peroxitánico se descompone en dióxido de titanio, principalmente en la

forma alotrópica de anatasa.

La suspensión resultante de nanopartículas tiene un pH cercano a neutro y un aspecto opaco y es estable con el paso del tiempo.

5 Las suspensiones obtenidas según uno cualquiera de los ejemplos 1 a 3 o las suspensiones obtenidas en cualquier otro método adecuado y que contienen al menos óxido metálico o metaloide con la fórmula  $AO_x$  o en cualquier caso óxido metálico o metaloide con la fórmula  $AO_x$  en cualquier otra forma adecuada, por ejemplo, en forma de polvo, están hechas para reaccionar con un ligando bifuncional (L) adecuado, de modo que el ligando L es adsorbido en las partículas del óxido  $AO_x$ .

10 El número de moléculas de ligando L absorbidas en cada molécula de óxido  $AO_x$  depende de las características del ligando L y del óxido  $AO_x$ .

A continuación, se añade una solución acuosa o alcohólica que contiene iones metálicos  $Me^{n+}$ , por ejemplo, iones de  $Ag^+$  o  $Cu^{2+}$ , de modo que los iones metálicos  $Me^{n+}$  son absorbidos en la molécula del ligando L, obteniéndose la estructura mostrada en la Figura 1.

15 Por lo tanto, se obtiene una suspensión o una solución que contiene una composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ .

A continuación, es posible añadir un tensioactivo catiónico a la suspensión de nanomateriales con la funcionalidad de los iones metálicos  $Me^{n+}$ , o es posible su adición independientemente o su adsorción en el óxido  $AO_x$ .

**Ejemplo 4 Adsorción de ácido 4-mercaptofenilborónico e iones  $Ag^+$  en “TiO<sub>2</sub> P25” (comercializado por Degussa)**

20 Se añade 1 g de TiO<sub>2</sub> P25 (comercializado por Degussa) a una solución que contiene  $2 \cdot 10^{-5}$  moles de ácido 4-mercaptofenilborónico disuelto en 50 ml de etanol.

La suspensión se agita durante 24 horas. El ácido 4-mercaptofenilborónico tiene una banda de absorción en 255 nm, atribuible a la transición  $\pi-\pi^*$  en el anillo fenólico.

25 Esta banda de absorción electrónica permite controlar la adsorción del ácido borónico en la superficie del nanomaterial en función del tiempo.

Es conocido que la adsorción se produce por la interacción de la función borónica con la superficie del semiconductor.

Los espectros de absorción electrónica demuestran que la cantidad de ácido 4-mercaptofenilborónico adsorbida en la superficie del “TiO<sub>2</sub> P25” alcanza el 35% de la concentración inicial en 24 horas.

30 La solución se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm, obteniéndose una solución clara, enjuagándose el sólido con 20 ml de etanol, realizándose nuevamente su suspensión con 50 ml de etanol mientras se agita.

A esta suspensión se añaden  $7,2 \cdot 10^{-6}$  moles de una sal de plata soluble, preferiblemente lactato de plata o acetato de plata.

La suspensión obtenida tiene color blanco, es inodora y estable con el paso del tiempo.

35 Se obtiene una suspensión que contiene una composición con la formación general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , donde  $AO_x$  es TiO<sub>2</sub>, L es 4-mercaptofenilborónico y  $Me^{n+}$  es  $Ag^+$ .

**Ejemplo 5 Adsorción de ácido 4-mercaptofenilborónico e iones  $Ag^+$  en suspensiones transparentes de TiO<sub>2</sub> obtenidas según el ejemplo 1 y en productos de la marca NMTech**

40 Se diluyen 100 ml de una solución transparente de dióxido de titanio preparada según el método (A) y que contiene el 15% de TiO<sub>2</sub> en 100 ml de agua destilada y en 200 ml de una solución de 0,052 g de ácido 4-mercaptofenilborónico disuelto en etanol.

La suspensión se agita durante 24 horas, revelando al final de dicho periodo una determinación espectrofotométrica que el ácido borónico ha sido totalmente adsorbido en las nanopartículas semiconductoras.

45 Las pequeñas dimensiones de las nanopartículas con respecto al “TiO<sub>2</sub> P25” y la mayor área superficial correspondiente de la materia suspendida son responsables de la total adsorción del ligando bifuncional.

A la suspensión inodora transparente se añade con agitación una cantidad estequiométrica (con respecto a L) de una sal de plata, p. ej., lactato de plata (0,06 g) o acetato de plata (0,05 g).

Después de 1 hora de agitación continua, se añaden 10-20 ml, preferiblemente 12 ml, de una solución acuosa al 50% (en peso) de cloruro de benzalconio y la suspensión se agita durante 1 hora más.

- 5 La suspensión concentrada se diluye a continuación con agua destilada y etanol para obtener 1 L de una suspensión opalescente (pH≈2) que contiene TiO<sub>2</sub> en una concentración del 1,5% y etanol entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 50%, preferiblemente, aproximadamente el 25%.

Se comprueba que la suspensión transparente es estable indefinidamente.

Se obtiene una suspensión que contiene una composición que tiene la fórmula general AO<sub>x</sub>-(L-Me<sup>n+</sup>)<sub>i</sub>, donde AO<sub>x</sub> es TiO<sub>2</sub>, L es ácido 4-mercaptofenilborónico y Me<sup>n+</sup> es Ag<sup>+</sup>, y que comprende además una sal de amonio cuaternario, tal como cloruro de benzalconio.

- 10 En adelante, a este producto se hará referencia como "Bactercline" a efectos de brevedad.

Es posible utilizar el mismo procedimiento para modificar suspensiones transparentes de nanomateriales comercializadas por NM Tech Ltd., y designadas "PSO 419", ajustándose las cantidades de ligando bifuncional y de iones de plata basándose en la cantidad de dióxido de titanio en el producto.

- 15 Por ejemplo, el producto "PSO-419 D2", que es similar al producto preparado según el ejemplo 1, y que tiene un contenido de TiO<sub>2</sub> del 2% y un pH 2, puede transformarse en un producto antibacteriano y antiviral usando un método análogo al descrito anteriormente.

De forma específica, se diluyen 50 ml de solución "PSO-419 D2" que contiene el 2% de TiO<sub>2</sub> con 2,2 mg de ácido 4-mercaptofenilborónico (2,05x10<sup>-5</sup> M) y la suspensión se agita durante 24 horas.

A la solución inodora resultante se añaden 2,05x10<sup>-5</sup> M de lactato de plata o acetato de plata.

- 20 Finalmente, después de 1 hora de agitación continua, se añaden 8-20 ml, preferiblemente 12 ml, de solución acuosa de cloruro de dimetil bencil dodecil amonio (50% en peso) y la suspensión se agita durante 1 hora más.

La suspensión transparente resultante es estable indefinidamente.

- 25 Debe observarse que es posible tratar otros productos opacos comercializados por NM Tech Ltd., tal como "AT-01" y "AT-03", basados en TiO<sub>2</sub>, según los métodos descritos según la presente invención a efectos de crear suspensiones o polvos estables con actividad antibacteriana y antiviral.

Por ejemplo, se diluyen 50 ml de una solución de "AT-01" que contiene el 1,7% de TiO<sub>2</sub> con 50 ml de etanol que contiene 3,8 mg de ácido 4-mercaptofenilborónico disuelto (1,9x10<sup>-5</sup> M), y la suspensión se agita durante 24 horas, obteniéndose un producto inodoro. A continuación, se añaden 1,9x10<sup>-5</sup> M de lactato de plata o acetato de plata. La suspensión resultante crea un precipitado fino después de un periodo de tiempo.

### 30 **Ejemplo 6 Adsorción de tensioactivos catiónicos en dióxido de titanio**

Los tensioactivos catiónicos con actividad antibacteriana son generalmente adsorbibles en nanomateriales basados en TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>, ZnO y SiO<sub>2</sub>.

La adsorción se produce de manera prácticamente instantánea en nanopartículas cargadas negativamente o neutras.

- 35 En el caso de suspensiones de nanomateriales con pH básico, la adición de sales de tipo benzalconio, tal como, por ejemplo, cloruro de bencil dodecil dimetil amonio o cloruro de bencil hexadecil dimetil amonio o cloruro de benzalconio, provoca la precipitación de la suspensión; mientras que en el caso de suspensiones de nanomateriales con pH neutro o ácido la suspensión es estable.

- 40 Ensayos indirectos de la adsorción de cloruro de benzalconio en nanomateriales basados en TiO<sub>2</sub> con pH neutro utilizan mediciones conductimétricas.

La asociación a través de adsorción del catión de bencil dialquil amonio en el TiO<sub>2</sub> debería provocar de forma previsible una reducción de la conductividad, tal como se verifica en el siguiente experimento.

Una solución de cloruro de benzalconio al 50% (en peso) diluido según una relación 1:10 tiene una conductividad de 4,7 mS.

- 45 Si el volumen de esta solución aumenta de 10 a 15 ml mediante la adición de agua destilada, la conductividad se reduce a 3,90 mS. Si la solución se diluye añadiendo 5 ml de una suspensión neutra de dióxido de titanio preparada, por ejemplo, según el ejemplo 3, a partir de ácido peroxitánico o del producto equivalente "AT-03" con pH neutro, la conductividad medida es 3,60 mS.



La reducción de la conductividad en 300  $\mu\text{S}$  es atribuible a la adsorción del tensioactivo catiónico en la superficie del dióxido de titanio.

Por lo tanto, es posible obtener una suspensión muy estable en la que las sales de amonio cuaternario son absorbidas en la molécula del  $\text{AO}_x$ , en este caso, del  $\text{TiO}_2$ .

- 5 Además, es posible añadir una única sal de amonio cuaternario o también una mezcla de diferentes sales de amonio cuaternario, preferiblemente una mezcla de sales con el mismo anión, tal como sales de cloruro de amonio.

**Ejemplo 7 Adsorción de ácido 2,2'-dipiridil-4-carboxi-4'-carboxilato,  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$  en "TiO<sub>2</sub> P25" (comercializado por Degussa)**

- 10 El ácido de anión de 2,2'-dipiridil-4-carboxi-4'-carboxilato (abreviado, "Hdcb") se produce añadiendo un equivalente de hidróxido de tetrabutilamonio (abreviado, TBAOH) a ácido 2,2'-dipiridil-4,4' dicarboxílico (abreviado,  $\text{H}_2\text{dcb}$ ), que es apenas soluble y en forma sólida.

Por lo tanto, el ligando en la forma de monocarboxilato (también denominada "forma monoprotónada"), y como una sal de tetrabutilamonio (abreviada "TBA(Hdcb)"), puede solubilizarse en metanol o etanol y puede ser adsorbida en dióxido de titanio.

- 15 A una solución de  $1 \times 10^{-4}$  moles de TBA(Hdcb) en 100 ml de etanol se añaden 5 g de "TiO<sub>2</sub> P25" (comercializado por Degussa). La suspensión se agita durante 24 horas.

El ligando TBA(Hdcb) tiene una banda de absorción en 294 nm debido a las transiciones  $\pi - \pi^*$ , lo que permite controlar su adsorción en nanomateriales en función del tiempo.

El ligando es totalmente adsorbido en la superficie del sustrato nanocristalino.

- 20 Es conocido que la adsorción se produce por la interacción de las funciones del carboxilo con la superficie del semiconductor.

La suspensión se centrifuga a continuación 10 minutos a 4000 rpm y el sólido se enjuaga con 50 ml de metanol. Finalmente, el nanomaterial obtenido con la funcionalidad del ligando (abreviado,  $\text{TiO}_2/\text{TBA}(\text{Hdcb})$ ) se seca al vacío a temperatura ambiente.

- 25 Dos partes de 2 g cada una de  $\text{TiO}_2/\text{TBA}(\text{Hdcb})$  se suspenden en 100 ml de etanol.

A una suspensión se añaden 8 mg de lactato de plata con agitación y a la otra suspensión se añaden 7 mg de  $\text{CuCl}_2$ .

- 30 Las dos suspensiones presentan diferentes estabildades: la suspensión con funcionalidad de iones de cobre  $\text{TiO}_2/\text{TBA}(\text{Hdcb})/\text{Cu}^{2+}$  permanece estable, mientras que la suspensión con funcionalidad de iones de plata  $\text{TiO}_2/\text{TBA}(\text{Hdcb})/\text{Ag}^+$  precipita con el paso del tiempo.

**Ejemplo 8 Adsorción de ligandos organometálicos (L) e iones  $\text{Ag}^+$  en suspensiones neutras de  $\text{TiO}_2$**

- 35 Tal como se ha descrito anteriormente, los ligandos L organometálicos bifuncionales pueden ligarse a suspensiones neutras de dióxido de titanio preparadas, por ejemplo, según el método del ejemplo 3, con los nanomateriales suspendidos en soluciones de alcohol con una concentración aproximada de  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  M de los ligandos organometálicos bifuncionales.

La suspensión se agita durante 12 horas, tiempo durante el cual el ligando organometálico L es totalmente adsorbido en la superficie de los nanomateriales.

- 40 La adición de cantidades estequiométricas de plata con respecto al ligando L en una solución alcohólica se corresponde con la formación de aductos donde el ion de plata  $\text{Ag}^+$  queda ligado al ligando inorgánico, tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 1 en el caso del complejo  $(\text{H}_2\text{dcb})_2\text{Ru}(\text{NCS})_2$  ( $\text{H}_2\text{dcb}$  = 2,2'-dipiridil-4,4'-ácido dicarboxílico).

La presencia de las funciones de carboxilo permite la adsorción del complejo y una cobertura homogénea del material nanocristalino durante un periodo de tiempo del orden de 2-3 horas a 50 °C y de 12 horas a temperatura ambiente.

- 45 En una etapa posterior, una sal de plata, p. ej., nitrato de plata, lactato de plata o acetato de plata, se añade a la solución metanólica según una relación estequiométrica de 2:1 con respecto a los moles de  $(\text{H}_2\text{dcb})_2\text{Ru}(\text{NCS})_2$ .

La presencia de los dos grupos NCS permite ligar instantáneamente los iones de  $\text{Ag}^+$ , tal como se muestra en la Figura 2.

Se comprueba la actividad antibacteriana y antiviral de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , de forma específica, haciendo referencia a productos obtenidos según uno cualquiera de los ejemplos 1 a 8.

5 El ensayo se lleva a cabo depositando películas que comprenden los diferentes nanomateriales obtenidos según los ejemplos descritos anteriormente en cápsulas Petri en contacto con varias colonias de *Escherichia Coli* más grandes que  $10^4$  cfu (unidades de formación de colonia).

En todos los casos se observa una mortalidad completa de las colonias.

10 Se llevan a cabo mediciones más exhaustivas según los estándares UNI-EN 1276 de abril de 2000 y UNI-EN 13697 de diciembre de 2001 para el producto sintetizado según el método del ejemplo 5 (producto designado "Bactercline"), siendo dicho producto transparente y, por lo tanto, aplicable en un abanico más amplio de aplicaciones.

Se llevan a cabo ensayos para evaluar las propiedades bactericidas, antimicóticas, antivirales de una solución del producto denominado "Bactercline" que contiene una composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , donde  $AO_x$  es  $TiO_2$ , L es 4-mercaptofenilborónico y  $Me^{n+}$  es  $Ag^+$  y, según el caso, que comprende además una sal de amonio cuaternario, tal como cloruro de benzalconio.

15 Es posible obtener un producto de este tipo mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, según los métodos de los ejemplos 4, 5, 6.

La actividad bactericida de "Bactercline" se evalúa usando el método de dilución y neutralización según el método estándar UNI-EN 1276 de abril de 2000.

20 Se usan las siguientes cepas para el ensayo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis D1*, *Listeria monocytogenes*.

Todas las cepas de bacteria sobre las que se realiza el ensayo fueron suministradas por el departamento de medicina experimental y diagnóstica, sección de microbiología, de la universidad de Ferrara.

El producto "Bactercline" sobre el que se realiza el ensayo se diluye al 80%.

25 Se considera que la sustancia sobre la que se realiza el ensayo es bactericida si para cada cepa de bacteria se obtiene una reducción de vitalidad al menos de  $10^5$  unidades a 20 °C después de un tiempo de contacto de 5 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente **Tabla 1**.

Los resultados obtenidos indican que, en todos los casos, se obtiene una reducción de vitalidad superior a  $10^5$  unidades.

30 **Tabla 1**

MICROORGANISMOS	Logaritmo de la actividad antimicrobiana	
	50%	80%
Concentración de la solución de "Bactercline"		
<b>Staphylococcus aureus</b>	$>3,27 \cdot 10^5$	$>4,02 \cdot 10^5$
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	$>1,23 \cdot 10^5$	$>4,00 \cdot 10^5$
<b>Escherichia coli</b>	$>1,20 \cdot 10^5$	$>4,00 \cdot 10^5$
<b>Enterococcus faecalis</b>	$>1,55 \cdot 10^5$	$>4,19 \cdot 10^5$
<b>Salmonella enteridis D1</b>	$>1,21 \cdot 10^5$	$>4,21 \cdot 10^5$
<b>Listeria monocytogenes</b>	$>5,56 \cdot 10^5$	$>4,24 \cdot 10^5$

35 Basándose en los resultados obtenidos y los criterios de validez de los ensayos, la sustancia "Bactercline" sobre la que se realiza el ensayo es bactericida al ser usada en una concentración del 80% (que es la concentración máxima sobre la que es posible realizar el ensayo) después de 5 minutos de contacto con la presencia de albúmina bovina en una concentración final del 0,3% según el método del estándar UNI-EN 1276 de abril de 2000.

"Bactercline" es bactericida también al usarse en una concentración del 50% después de 5 minutos de contacto con la presencia de albúmina bovina en una concentración final del 0,3%, según el método del estándar UNI-EN 1276 de abril de 2000, ya que con esta concentración también se obtiene una reducción de vitalidad de más de  $10^5$  unidades.

Por lo tanto, la actividad bactericida de "Bactercline" es muy alta.

También se lleva a cabo un ensayo superficial para evaluar la actividad bactericida de "Bactercline" según el método estándar UNI-EN 13697 de diciembre de 2001.

Se usan las siguientes cepas para los ensayos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis D1*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella Pneumophila*.

- 5 Se considera que la sustancia sobre la que se realiza el ensayo es bactericida contra las cepas de bacteria según el estándar europeo si para cada cepa de bacteria se obtiene una reducción de vitalidad al menos de  $10^4$  unidades a 20 °C después de un tiempo de contacto de 5 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente **Tabla 2**.

- 10 Dichos valores indican que, en todos los casos, el logaritmo decimal de la actividad antimicrobiana es superior a 4 y, por lo tanto, que "Bactercline" es un producto bactericida.

- 15 Basándose en los resultados obtenidos y los criterios de validez de los ensayos, la sustancia "Bactercline" sobre la que se realiza el ensayo según las condiciones de ensayo establecidas es bactericida contra los microorganismos sobre los que se realiza el ensayo al usarse en una concentración del 100% después de 5 minutos en contacto con la presencia de albúmina bovina en una concentración final del 0,3% según el método del estándar UNI-EN 13697 de diciembre de 2001.

**Tabla 2**

MICROORGANISMOS	Logaritmo de la actividad antimicrobiana
<b>Staphylococcus aureus</b>	>4,00
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	>4,03
<b>Escherichia coli</b>	>4,02
<b>Enterococcus faecalis</b>	4,19
<b>Salmonella enteridis D1</b>	>4,21
<b>Legionella Pneumophila</b>	>4,26
<b>Listeria monocytogenes</b>	>4,24

La actividad antimicótica o fungicida de "Bactercline" se evalúa usando el método de dilución y neutralización según el método estándar UNI-EN 1650 de octubre de 2000.

- 20 Se usan las siguientes cepas para el ensayo: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

Las cepas sobre las que se realiza el ensayo fueron suministradas por el departamento de medicina experimental y diagnóstica, sección de microbiología, de la universidad de Ferrara.

Se considera que la sustancia sobre la que se realiza el ensayo es fungicida si para cada cepa micótica se obtiene una reducción de vitalidad al menos de  $10^4$  unidades a 20 °C después de un tiempo de contacto de 15 minutos.

- 25 Los ensayos se repiten para diferentes valores de la concentración de "Bactercline", mostrándose los resultados obtenidos en la **Tabla 3**.

**Tabla 3**

MICROORGANISMOS ENSAYO	REDUCCIÓN DE VITALIDAD		
	25%	50%	80%
Concentración de "Bactercline"			
<b>Candida albicans</b>	>1,13x10 <sup>4</sup>	>1,13x10 <sup>4</sup>	>1,13x10 <sup>4</sup>
<b>Aspergillus niger</b>	<1,87x10 <sup>3</sup>	>1,37x10 <sup>4</sup>	>1,37x10 <sup>4</sup>

- 30 Basándose en los resultados obtenidos y los criterios de validez de los ensayos, la sustancia "Bactercline" sobre la que se realiza el ensayo es antimicótica contra *Candida albicans* en concentraciones del 25%, 50% y 80% y contra *Aspergillus niger* en concentraciones del 50% y el 80% (que es la concentración máxima sobre la que es posible realizar el ensayo) después de 15 minutos de contacto con la presencia de albúmina bovina en una concentración final del 0,3% según el método del estándar UNI-EN 1650 de octubre de 2000.

La actividad antimicótica de "Bactercline" se evalúa también usando el ensayo superficial según el método estándar UNI-EN 13697 de diciembre de 2001.

Se usan las siguientes cepas para el ensayo: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

5 Las cepas sobre las que se realiza el ensayo fueron suministradas por el departamento de medicina experimental y diagnóstica, sección de microbiología, de la universidad de Ferrara.

Se considera que la sustancia sobre la que se realiza el ensayo es antimicótica si el logaritmo de la actividad antimicrobiana contra las cepas de microbio según el estándar europeo es superior o igual a 3 durante 15 minutos de contacto a 20 °C. Los resultados de los ensayos se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4**

MICROORGANISMOS ENSAYO	Logaritmo de la actividad antimicrobiana	
Concentración de "Bactercline"	50%	100%
<b>Candida albicans</b>	2,02	> 3,18
<b>Aspergillus niger</b>	1,14	> 3,04

10

Basándose en los resultados obtenidos y los criterios de validez de los ensayos, la sustancia "Bactercline" sobre la que se realiza el ensayo en las condiciones de ensayo establecidas es antimicótica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* al usarse en una concentración del 100% después de 15 minutos de contacto con la presencia de albúmina bovina en una concentración final del 0,3% según el método del estándar UNI-EN 13697 de diciembre de 2001.

15

Además, se comprueba la actividad antiviral de "Bactercline".

Los experimentos descritos a continuación demuestran que el producto "Bactercline", en concentraciones muy bajas, presenta una gran actividad antiviral contra el *virus HSV-1 (virus del herpes simple-1)*.

20

Se preparan diversas cantidades de suspensiones virales en un medio Dulbecco modificado (D-MEM) al que se ha añadido el 1% de suero fetal bovino (BFS).

Se usa una concentración de virus (título de virus) de  $1 \times 10^6$  unidades de formación de placa citolítica (Pfu).

Se añaden diferentes cantidades de "Bactercline" en diferentes muestras, con tiempos de tratamiento previo de 1 y 5 horas.

Las suspensiones virales sin tratar se mantienen como un control.

25

Después de un periodo de incubación a temperatura ambiente, la totalidad de las muestras se diluyen en volúmenes conocidos para determinar los títulos de los virus.

Los títulos virales de los controles y de las muestras tratadas con "Bactercline" se determinan mediante el método descrito a continuación.

Al determinar el título viral es posible calcular el número de infecciones presentes en 1 ml de solución.

30

Se usa un método para determinar el número de placas de citólisis producidas por una suspensión viral suficientemente diluida y en contacto con una monocapa de células.

En esta serie de experimentos se usan células renales de mono africano (Vero).

Las células se cultivan a 37 °C, con la presencia del 5% de CO<sub>2</sub> en "D-MEM", añadiéndose el 10% de BFS, el 1% de L-glutamina y el 1% de penicilina/estreptomomicina.

35

La determinación del título se lleva a cabo en placas con 12 compartimentos.

Cuando los cultivos son prácticamente confluentes, los virus se diluyen en concentraciones conocidas en un medio que contiene el 2% de BFS.

Para cada dilución se inoculan 2 compartimentos en la placa.

40

Después de una incubación de 1 hora a 37 °C, el inóculo se retira y la infección es bloqueada añadiendo un medio que contiene el 1% de BFS y el 2% de gamma globulina humana, que tiene la función de inhibir la formación de placas secundarias.

Los cultivos inoculados se incuban a 37 °C durante 2 días, siendo controlados hasta que las placas de lisis son visibles. En este punto, las células se fijan y tiñen con violeta de genciana.

Bajo un microscopio óptico se cuentan las placas presentes en los compartimentos, y este recuento se multiplica por el factor de dilución para obtener el título viral en unidades de Pfu/ml.

- 5 El producto “Bactercline”, en una cantidad de 10 y 50 microlitros, contacta con HSV-1 con un título viral de  $1 \times 10^6$  Pfu.

La incubación se lleva a cabo en 1 ml de medio D-MEM al que se añade el 1% de BFS.

Se usan dos tiempos distintos de incubación: 1 hora y 5 horas.

Después del periodo de incubación determinado, el virus se diluye en concentraciones de  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^2$  Pfu y se inoculan los cultivos prácticamente confluentes.

- 10 Tal como se muestra en la Tabla 5, las células inoculadas con el virus tratado previamente con “Bactercline” no tienen placas de lisis con cualquiera de los tiempos de tratamiento previo y cualquiera de las diluciones de virus.

Los ensayos sobre la actividad antiviral del producto “Bactercline” muestran que el producto tiene actividad antiviral para su contacto directo con el virus HSV-1 incluso con diluciones extremas del producto, con un tiempo de contacto de 1 hora.

- 15 Los experimentos llevados a cabo, cuyos resultados se representan en la siguiente **Tabla 5**, demuestran que con un nivel de dilución del producto del orden de 1:100 se consigue una mortalidad prácticamente total de las partículas virales.

**Tabla 5**

Pretratamiento de HSV-1 en un título de $1 \times 10^6$ con 10 $\mu$ L y 50 $\mu$ L del producto sobre el que se realiza el ensayo:									
Dilución del HSV-1 ( $1 \times 10^3$ Pfu)									
Promedio de los controles (Pfu)		Promedio de las muestras tratadas con 10 $\mu$ L (Pfu)		Inhibición de formación de placas (%)	Promedio de las muestras tratadas con 50 $\mu$ L (Pfu)		Inhibición de formación de placas (%)	Título viral de los controles	
1 hr	5 hr	1 hr	5 hr	1 hr, 5 hr	1 hr	5 hr	1 hr, 5 hr	1 hr	5 hr
63	78			100	0		100	$2,63 \times 10^5$	$1,78 \times 10^5$

- 20 **Ejemplo 9 Método de producción de una crema para uso tópico que contiene la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$**

Mediante el uso de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  es posible obtener numerosos tipos diferentes de productos de tratamiento tópico de uso tópico, ya que la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  puede mezclarse de forma adecuada con muchas sustancias diferentes.

- 25 Por ejemplo, es posible obtener una crema de tratamiento tópico usada para tratar acné.

En la siguiente **Tabla 6** se muestra el contenido en porcentaje de una crema de uso tópico para tratar acné.

**Tabla 6**

Compuesto	Porcentaje [%]	Estado físico	Fase adición
Agua	72,23	Líquido	B
PPG-15-esterariléter	15	Líquido	A
Steareth-2	5	Sólido céreo	A
$AO_x-(L-Me^{n+})_i$	2	Polvo	C
Alcohol cetearílico	1,6	Sólido céreo	A
Cloruro de benzalconio	1,2	Líquido	C

Compuesto	Porcentaje [%]	Estado físico	Fase adición
Stearth-21	1	Sólido céreo	A
Dimeticona	1	Líquido	A
Metilparabeno	0,3	Polvo	B
Propilparabeno	0,2	Polvo	B
Ácido cítrico	0,2	Sólido cristalino	B
Dehidroacetato sódico	0,15	Polvo	B
Hidroxianisol butilado (BHA)	0,05	Sólido cristalino	A
Hidroxitolueno butilado (BHT)	0,05	Sólido cristalino	A
2,4 Bromonitropropanol	0,02	Sólido cristalino	C

Los compuestos mencionados anteriormente se pesan y dosifican.

Un turboemulsificador se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 65 °C-70 °C.

- 5 Fase "A": Los compuestos con el valor "A" en la cuarta columna de la tabla 1 anterior se introducen en un turboemulsificador y se mezclan entre sí. El turboemulsificador se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 70 °C-80 °C, de modo que los compuestos en el turboemulsificador se funden.

Es necesario alcanzar la fusión total de los compuestos, de modo que es posible obtener una mejor mezcla.

- 10 Fase "B": Un turboemulsificador adicional se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 75 °C-80 °C. Los compuestos con el valor "B" en la cuarta columna de la tabla 6 anterior se introducen en el turboemulsificador adicional, mezclándose entre sí.

Cuando los compuestos en el turboemulsificador y en el turboemulsificador adicional alcanzan los valores de temperatura deseados, el turboemulsificador y el turboemulsificador adicional se cierran y funcionan de modo que los compuestos respectivos en el turboemulsificador y en el turboemulsificador adicional pueden mezclarse y homogeneizarse.

- 15 De este modo, se acciona una bomba de vacío conectada al turboemulsificador y los compuestos en el turboemulsificador adicional se vierten en el turboemulsificador, es decir, los compuestos de fase "B" se vierten en los compuestos de fase "A".

- 20 El turboemulsificador funciona durante un número reducido de minutos, de modo que los compuestos de fase "A" y de fase "B" se mezclan y homogeneizan entre sí, pudiendo comprobarse la mezcla real de la mezcla y, en caso necesario, siendo posible activar nuevamente el turboemulsificador.

Una vez se ha obtenido la mezcla deseada de la mezcla, se acciona la bomba de vacío y el turboemulsificador se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 45 °C-50 °C.

Una vez se alcanza este valor de temperatura, la bomba de vacío se desactiva y los compuestos con el valor "C" en la cuarta columna de la tabla 6 anterior se introducen en el turboemulsificador.

- 25 El turboemulsificador y la bomba de vacío funcionan ambos para que los compuestos puedan mezclarse y homogeneizarse entre sí y el turboemulsificador se enfría durante la homogeneización hasta una temperatura de aproximadamente 20 °C-30 °C.

Este valor de temperatura se mantiene durante un intervalo de tiempo determinado durante el que los compuestos se mezclan de forma continua.

- 30 Una vez ha transcurrido un intervalo de tiempo determinado, el producto puede extraerse del turboemulsificador y analizarse.

El análisis llevado a cabo demuestra que el producto es muy estable con el paso del tiempo y puede envasarse en operaciones de envasado posteriores y almacenarse sin ningún riesgo de separaciones de los compuestos individuales del producto.

- 35 El producto obtenido, al que se hace referencia en adelante como "**Bactercline acne**" a efectos de brevedad, es una emulsión que contiene la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  y aditivos y/o otros principios activos que es posible usar para preparar productos de tratamiento tópico.

Una emulsión de este tipo está en estado cremoso y puede ser usada para tratar numerosas enfermedades y, de forma específica, afecciones de acné.

Gracias a las dimensiones muy limitadas de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  y a sus características, se obtiene una emulsión con características muy homogéneas.

- 5 Por ejemplo, como composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  es posible usar una composición que contiene dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) como  $AO_x$ , perclorato de plata ( $Ag^+ClO_4^-$ ) como  $Me^{n+}$  y un ligando bifuncional L adecuado para ligar el dióxido de titanio y el perclorato de plata.

Preferiblemente, 2 g de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  contienen 1,998 g de  $TiO_2$ , 0,0084 g de  $AgClO_4$  y 0,0062 g de ácido 4-mercaptofenilborónico como ligando bifuncional L.

- 10 También está presente una sal de amonio cuaternario, es decir, cloruro de benzalconio.

También es posible obtener preparaciones similares usando como ligando bifuncional L ácido 6-mercaptonicotínico y/o ácido 11-mercaptoundecanoico y/o ácido mercaptosuccínico.

“Bactercline acné” es una emulsión cremosa inodora de color blanco, con una densidad de aproximadamente 0,995-1,005 g/cm<sup>3</sup> y una viscosidad de aproximadamente 50.000-60.000 centipoises.

- 15 La emulsión cremosa obtenida puede extenderse sobre la piel, preferiblemente dos veces al día, y gracias a sus características físicas la crema puede extenderse muy fácilmente y forma en la piel del usuario una capa protectora que es invisible y, por lo tanto, no perceptible, y que desinfecta la piel, permitiendo tratar las afecciones de acné.

- 20 Extendiendo “Bactercline acné” dos veces al día sobre la piel afectada por el acné y/o el herpes, se curan las lesiones debidas al acné y/o al herpes y se evita cualquier contagio adicional de diferentes zonas de la piel del usuario.

La crema forma en la piel del usuario una capa protectora de acción múltiple: la misma protege la zona de la piel de lesiones debidas a cualquier infección externa y/o infecciones microbianas, protege dicha zona de cualquier agresión externa, por ejemplo, del viento y/o la radiación solar, y también evita la extensión de cualquier contagio en diferentes zonas de la piel del usuario y también cualquier proliferación microbiana en dicha zona.

- 25 Esto permite una regeneración muy rápida de la piel dañada y evita la propagación del contagio, permitiendo por lo tanto tratar de forma exitosa las enfermedades de la piel.

Una crema de este tipo también puede usarse de forma práctica para tratar enfermedades tópicas de virus herpes.

Extendiendo la crema dos veces al día sobre la piel afectada por el herpes las lesiones en la piel debidas al herpes se curan, evitándose cualquier contagio adicional en diferentes zonas de la piel del usuario.

- 30 El proceso para producir la crema es muy sencillo y la fase de adición de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  no interfiere con el proceso habitual para producir un producto de tratamiento tópico.

Por lo tanto, es posible usar procesos similares para producir numerosos productos de tratamiento tópico diferentes que contienen la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  y aditivos o principios activos diferentes a los descritos anteriormente.

- 35 Por lo tanto, es posible obtener productos de tratamiento tópico útiles en diferentes usos tópicos y para tratar numerosas enfermedades diferentes.

Además, es posible añadir la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  a numerosos tipos diferentes de productos de tratamiento tópico, tal como crema evanescente, crema de afeitar, crema antiarrugas, crema hidratante, crema protectora, crema de día o crema de noche, transmitiendo al producto de tratamiento tópico las propiedades antibacterianas, antivirales, antimicóticas.

- 40 Además, también es posible añadir la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  a productos de tratamiento tópico en otras formas diferentes a una crema, tal como, por ejemplo, gel, tejidos empapados con principios activos, toallitas, parches, cristales de líquido, composiciones de líquido con dos o más capas distintas, dispersiones, emulsiones, suspensiones, espumas, micro-gotas, microesferas, gránulos, microgránulos, microemulsiones; nanoemulsiones, emulsiones múltiples, p. ej., composiciones encapsuladas de agua-en aceite-en agua.

- 45 Además, el producto de tratamiento tópico producido según el proceso mencionado anteriormente y que contiene los compuestos de la tabla mencionada anteriormente es eficaz contra los siguientes microbios: bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Salmonella enteritidis D1*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella Pneumofila*; hongos: *Candida albicans*,  
50 *Aspergillus niger*; virus: *virus Herpes*.

Se llevan a cabo ensayos para evaluar la eficacia antiviral de "Bactercline acne" contra diferentes virus y, de forma específica, contra *Poliovirus* y *Adenovirus*.

5 Los ensayos se llevan a cabo según el procedimiento estándar descrito en el estándar europeo EN14476, mayo de 2002 (fase 2; etapa 1), editado por el European Standardization Committee para evaluar la actividad antiviral de "Bactercline acne".

Se añade una cantidad determinada de una suspensión viral a "Bactercline acne", en "estado limpio", es decir, en una solución de agua que contiene 0,3 g/l de albúmina bovina, y en "estado sucio", es decir, en una solución de agua que contiene 3,0 g/l de albúmina bovina y 0,3 ml de eritrocitos.

10 Se preparan suspensiones que contienen *Adenovirus tipo 5 (ATCC VR5)* y *cepa de Poliovirus 1 Sabin* con un título, evaluado como  $\text{Log}_{10}$  de  $\text{ID}_{50}$ , respectivamente, de *Adenovirus tipo 5* 5-8,15 para el *Adenovirus tipo 5* y 1-8,20 para la cepa de *Poliovirus 1 Sabin*, y con una relación de dilución diferente comprendida entre 0 (suspensión no diluida) y  $10^{-4}$ , entrando en contacto dichas suspensiones con capas de células HeLa aproximadamente al 90%, habiéndose cultivado dichas células en MEM con el 2% de FBC, para evaluar la concentración viral máxima que no provoca una mutación morfológica en las células.

15 Una concentración máxima de este tipo es  $10^{-1}$ .

Por lo tanto, en los ensayos se usan suspensiones no diluidas de virus.

Las suspensiones virales y "Bactercline acne" se mantienen en contacto a una temperatura aproximada de 20 °C durante intervalos de tiempo predeterminados: 1 minuto, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos.

20 Después de cada uno de dichos intervalos de tiempo, se retira una cantidad determinada de la mezcla que contiene la suspensión viral y "Bactercline acne", diluyéndose usando una relación de dilución de 1:10 con un medio esencial mínimo (MEM) y el 2% de suero de ternera fetal (FCS) para bloquear la actividad antiviral y analizándose a continuación para evaluar la actividad antiviral.

Se evalúa la actividad antiviral calculando la  $\text{ID}_{50}$ , es decir, la dilución de la suspensión viral que provoca efectos citopáticos en el 50% de las muestras, según el "método Spearman-Kärber".

25 Los resultados de los ensayos se muestran en las siguientes **Tabla 7** y **Tabla 8** para la suspensión de Poliovirus y Adenovirus 5, respectivamente.

**Tabla 7**

Tiempo contacto	Título viral "sucio"	Título viral "limpio"
60 min	-1,5	-1,1
30 min	-2,8	-2,0
10 min	-4,0	-3,0
1 min	-5,5	-4,8

**Tabla 8**

Tiempo contacto	Título viral "sucio"	Título viral "limpio"
60 min	-1,0	-1,0
30 min	-2,0	-1,5
10 min	-4,1	-2,5
1 min	-4,8	-4,5

30 Los valores en la segunda y tercera columnas de las tablas 7, 8 mencionadas anteriormente indican el logaritmo negativo del 50% del punto extremo.

35 Los resultados obtenidos muestran que se ha obtenido una reducción superior a  $4\text{Log}_{10}$  del título viral de las suspensiones en contacto con "Bactercline acne", en ambas suspensiones virales, en las muestras en estado "limpio" y "sucio"; las muestras tuvieron un intervalo de tiempo de contacto aproximadamente de 10 minutos.

Por lo tanto, se demuestra una elevada actividad antiviral de "Bactercline acne".



La metodología de estos ensayos se ha verificado para validar los resultados obtenidos. Dicha validación ha obtenido resultados positivos.

**Ejemplo 10 Método de producción de un producto de tratamiento tópico que contiene la composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$**

- 5 Usando la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  es posible obtener numerosos tipos diferentes de productos de tratamiento tópico, ya que la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  puede mezclarse de forma adecuada con muchas sustancias diferentes.

Por ejemplo, es posible obtener un producto que se usa para el tratamiento de úlceras, de forma específica, escaras o úlceras de decúbito.

- 10 En la siguiente **Tabla 9** se muestran los contenidos en porcentaje de una crema de uso tópico para tratar úlceras.

**Tabla 9**

Compuesto	Porcentaje [%]	Estado físico	Fase de adición
Agua	84,23	Líquido	B
Palmitato de isopropilo	3,6	Líquido	A
Petrolato	3	Sólido pastoso	A
Isohexadecano	2	Líquido	A
$AO_x-(L-Me^{n+})_i$	2	Polvo	C
Cloruro de benzalconio 50%	1,2	Líquido	C
Cera de abeja (Cera Alba)	1	Sólido céreo	A
PPG-15 esteariléter	1	Líquido	A
PEG-30 dipolihidroxiestearato	1	Sólido céreo	A
Metilparabeno	0,3	Polvo	B
Propilparabeno	0,2	Polvo	B
Ácido cítrico	0,2	Sólido cristalino	B
Dehidroacetato sódico	0,15	Polvo	B
Sulfato de magnesio	0,1	Sólido cristalino	B
2,4 Bromonitropropandiol	0,02	Sólido cristalino	C

Los compuestos mencionados anteriormente se pesan y dosifican.

Un turboemulsificador se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 65 °C-70 °C.

- 15 Fase "A": Los compuestos con el valor "A" en la cuarta columna de la tabla 2 anterior se introducen en un turboemulsificador y se mezclan entre sí. El turboemulsificador se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 65 °C-70 °C, de modo que los compuestos en el turboemulsificador se funden y los compuestos se mezclan al mismo tiempo.

Es necesario alcanzar la fusión total de los compuestos, de modo que es posible obtener una mejor mezcla.

- 20 Fase "B": Un turboemulsificador adicional se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 75 °C-80 °C. Los compuestos con el valor "B" en la cuarta columna de la tabla 2 anterior se introducen en el turboemulsificador adicional, mezclándose entre sí.

- 25 Cuando los compuestos en el turboemulsificador y en el turboemulsificador adicional alcanzan los valores de temperatura deseados respectivos, el turboemulsificador y el turboemulsificador adicional se cierran y funcionan de modo que los compuestos respectivos en el turboemulsificador y en el turboemulsificador adicional pueden mezclarse y homogeneizarse.

De este modo, se acciona una bomba de vacío conectada al turboemulsificador y los compuestos en el turboemulsificador adicional se vierten en el turboemulsificador, es decir, los compuestos de fase "B" se vierten en los compuestos de fase "A".

El turboemulsificador funciona durante unos cuantos minutos, de modo que los compuestos de fase "A" y de fase "B" se mezclan y homogeneizan entre sí, pudiendo comprobarse la mezcla real de la mezcla y, en caso necesario, siendo posible activar nuevamente el turboemulsificador.

5 Una vez se ha obtenido la mezcla deseada de la mezcla, se acciona la bomba de vacío y el turboemulsificador se enfría hasta una temperatura de aproximadamente 45 °C-50 °C.

Una vez se alcanza este valor de temperatura, la bomba de vacío se desactiva y los compuestos con el valor "C" en la cuarta columna de la tabla 9 anterior se introducen en el turboemulsificador.

10 El turboemulsificador y la bomba de vacío funcionan ambos para que los compuestos puedan mezclarse y homogeneizarse entre sí y el turboemulsificador se enfría durante la homogeneización hasta una temperatura de aproximadamente 20 °C-30 °C.

Este valor de temperatura se mantiene durante un intervalo de tiempo determinado durante el que los compuestos se mezclan de forma continua.

15 Una vez ha transcurrido un intervalo de tiempo determinado, el producto puede extraerse del turboemulsificador y analizarse. El análisis llevado a cabo demuestra que el producto es muy estable con el paso del tiempo y puede envasarse en operaciones de envasado posteriores y almacenarse sin ningún riesgo de separaciones de los compuestos individuales del producto.

El producto obtenido, denominado en adelante "**Bactercline ulcer**" a efectos de brevedad, es una emulsión que contiene la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ ; y aditivos y otros principios activos que es posible usar para obtener productos de tratamiento tópico.

20 "Bactercline ulcer" es una forma de crema que es posible usar para tratar numerosas úlceras de piel, de forma específica, úlceras de decúbito.

Gracias a las dimensiones muy limitadas de la composición con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ ; y a sus características, se obtiene una emulsión con características muy homogéneas.

25 Por ejemplo, como compuesto con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  es posible usar un compuesto que contiene dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) como  $AO_x$ , perclorato de plata ( $Ag^+ClO_4^-$ ) como  $Me^{n+}$  y un ligando bifuncional L adecuado para ligar el dióxido de titanio y el perclorato de plata.

Preferiblemente, 2 g del compuesto con la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  contienen 1,998 g de  $TiO_2$ , 0,0084 g de  $AgClO_4$  y 0,0062 g de ácido 4-mercaptofenilborónico como ligando bifuncional L.

30 También está presente una sal de amonio cuaternario, es decir, cloruro de benzalconio, que mejora las propiedades antibacterianas, antimicóticas, antimicrobianas, antivirales de "Bactercline ulcer".

También es posible obtener preparaciones de "Bactercline ulcer" similares usando como ligando bifuncional L ácido 6-mercaptonicotínico y/o ácido 11-mercaptoundecanoico y/o ácido mercaptosuccínico.

35 "Bactercline ulcer" es una emulsión cremosa inodora, una emulsión de agua-en aceite-en agua, de color blanco, con una densidad de aproximadamente 0,995-1,005 g/cm<sup>3</sup> y una viscosidad de aproximadamente 50.000-60.000 centipoises.

La emulsión cremosa obtenida puede extenderse sobre la piel, preferiblemente dos veces al día, y gracias a sus características físicas la crema puede extenderse muy fácilmente y forma en la piel del usuario una capa protectora que es invisible y, por lo tanto, no perceptible, y que desinfecta la piel, permitiendo tratar las úlceras.

40 Se comprueba la tolerancia cutánea de "Bactercline ulcer" en 50 voluntarios adultos aplicando un "parche de ensayo único" durante 48 horas bajo control dermatológico.

Los voluntarios comprenden 45 mujeres y 5 hombres con edades entre 18 y 65 años, con un promedio de edad de 40 años, con piel normal y que se corresponden con criterios de inclusión y no inclusión definidos por DERMASCAN Group.

45 Los criterios de inclusión especifican que los voluntarios han dado su consentimiento escrito informado, no presentan ninguna experiencia previa de intolerancia o reacciones alérgicas a productos cosméticos y pertenecen al fototipo I a III.

50 Ningún criterio de inclusión especifica que las personas que presentan las siguientes características no se incluyan como voluntarios en el estudio: mujeres embarazadas o que cuidan de sus bebés o mujeres que tienen previsto quedar embarazadas durante el estudio, personas con patología cutánea (eczema, psoriasis, vitíligo, pitiriasis versicolor, acné,...) en la zona del experimento; voluntarios que toman o dejaron de tomar: antibióticos, antihistamínicos, medicamentos antiinflamatorios sistémicos o corticoides durante la semana anterior, antitusivos o

5 corticoides durante las cuatro semanas anteriores, retinoides, medicamentos inmunosupresores, medicamentos contra el cáncer durante las seis semanas anteriores; voluntarios que empezaron, finalizaron o cambiaron tratamiento hormonal, incluyendo píldoras contraceptivas, en las cinco semanas anteriores; voluntarios cuya piel estuvo expuesta al sol o a rayos UV durante el mes anterior; voluntarios con piel muy sensible; voluntarios con una cantidad significativa de pelo en la espalda, pecas, lunares o un tatuaje en la espalda; voluntarios con enfermedades graves, voluntarios que consumen una cantidad excesiva de alcohol o tabaco.

El producto se aplica en la parte escapular de la espalda, usando un parche de ensayo del tipo "Finn Chambers ®" 8 mm (50 mm<sup>2</sup>), de tipo oclusivo, usando una dosis de producto para cada parche de ensayo de 25 µl del producto en estado puro.

10 Cada parche se mantiene en la piel de los voluntarios durante 48 horas.

También se aplican en los voluntarios parches de control sin el producto sobre el que se realiza el ensayo.

Después del intervalo de tiempo de 48 horas, los parches se retiran de la piel y, después de 30 minutos de su retirada, se lleva a cabo un examen macroscópico de la piel con lámparas de luz de día para evaluar el grado de irritación de cada una de las zonas de la piel que ha recibido el producto.

15 Esta evaluación se lleva a cabo comparando la irritación real de la piel con la obtenida con los parches de control negativo.

Si no se produce ninguna reacción local en la piel en la lectura 30 minutos después de la retirada del parche, el estudio finaliza.

20 No obstante, se pide a cada voluntario que confirme que no se produce ninguna reacción visible el día después. Si el voluntario tiene una reacción visible, el mismo debe volver y se toman lecturas hasta la reversibilidad de las reacciones cutáneas.

La escala de la siguiente **Tabla 10** se usa para evaluar el grado de irritación:

**Tabla 10**

Puntuación	Calificación	Descripción criterios	
		Eritema "E"	Edema "O"
0	Ausente	Aspecto normal, no eritema	Aspecto normal, no edema
0,5	Dudoso	Apenas perceptible: ligera coloración rosa de una parte de la zona sobre la que se realiza el ensayo	Palpable, apenas visible
1	Ligero	Coloración ligeramente rosa de toda la zona sobre la que se realiza el ensayo o bastante visible en una parte de la zona sobre la que se realiza el ensayo	Palpable, visible
2	Evidente	Eritema evidente que cubre toda la zona sobre la que se realiza el ensayo	Edema evidente con o sin pápulas o vesículas
3	Importante	Eritema severo que cubre toda la zona sobre la que se realiza el ensayo o eritema que se extiende fuera de la zona sobre la que se realiza el ensayo	Edema severo (que se extiende fuera de la zona sobre la que se realiza el ensayo) con o sin pápulas o vesículas

25 Un cambio en la estructura de la piel, por ejemplo, sequedad (D), aspereza (R1), espesor (T), reflectividad (R2), que podría estar asociado a la naturaleza del producto de uno de sus componentes, queda sujeto a una descripción clínica y se clasifica su intensidad según la siguiente escala: 0,5 = dudoso, 1=ligero, 2=evidente, 3=importante.

El análisis y la interpretación se llevan a cabo según los resultados obtenidos en las condiciones experimentales en cada lectura.

30 La tolerancia cutánea de la crema se evalúa calculando el "índice de irritación promedio" (MII) en cada lectura según la fórmula  $MII = (\Sigma \text{ total de puntuaciones de reacciones cutáneas}) / (\text{número total de voluntarios})$ , una reacción cutánea puede ser un eritema y/o un edema, en caso de presencia de eritema y edema, se suman las puntuaciones de las reacciones del eritema y del edema.

35 El índice MII obtenido se usa para clasificar arbitrariamente el producto que se estudia según la siguiente escala de la **Tabla 11**:

**Tabla 11**

M.I.I.	Clase
M.I.I.<0,20	No-irritante (NI)
0,20≤M.I.I.<0,50	Ligeramente irritante (SI)
0,50≤M.I.I.<1	Moderadamente irritante (MI)
M.I.I.≥1	Irritante (I)

Se calcula el M.I.I. para "Bactercline ulcer" 30 minutos después de la extensión de "Bactercline ulcer" sobre la piel de los voluntarios y 24 horas después de la extensión.

5 Ambos ensayos muestran un valor de M.I.I. para "Bactercline ulcer" de 0,00, por lo tanto, la crema producida es un producto no irritante.

Es posible aplicar consideraciones similares a "Bactercline acne", ya que la composición de los dos productos "Bactercline ulcer" y "Bactercline acne" es muy similar y, además, "Bactercline ulcer" contiene más compuestos potencialmente agresivos, por lo tanto, debido a que "Bactercline ulcer" no provoca ninguna irritación en la persona sobre la que se realiza en ensayo, incluso con más motivo "Bactercline acne" no tendrá ningún efecto de irritación.

10 En condiciones de ensayo, puede concluirse que el producto obtenido según el ejemplo 8 y sobre el que se realiza el ensayo bajo control dermatológico y aplicado pura y localmente debajo del parche oclusivo durante 48 horas en la piel de 50 voluntarios adultos se clasifica como no irritante en las lecturas de 30 minutos y 24 horas según el cálculo de M.I.I. El estudio es llevado a cabo del 17/07/06 al 20/07/06 y del 24/07/06 al 27/07/06 por la unidad clínica PROCOS, Varsovia, Polonia.

15 El estudio se lleva a cabo según las directrices de buenas prácticas clínicas de FDA (FR de 08/08/1978 Parte V - Decreto No. 77N-0278), EEC (Directivas No. 91/507 y III 3976/88 de 11/07/1990) y del ministerio de salud de la República Francesa.

20 El estudio se lleva a cabo según los procedimientos de funcionamiento estándar y el protocolo definido por el espónsor.

Se reportan todos los acontecimientos del ensayo registrados durante el estudio.

Se llevan a cabo controles sobre la veracidad de los datos y su conformidad con el protocolo y se confirman por personas que participan en el estudio.

25 Los ensayos se llevan a cabo según el procedimiento estándar descrito en el estándar europeo EN14476, mayo de 2002 (fase 2; etapa 1), editado por el European Committee for standardization para evaluar la actividad antiviral de "Bactercline ulcer".

Se añade una cantidad determinada de una suspensión viral a "Bactercline ulcer", en "estado limpio", es decir, en una solución de agua que contiene 0,3 g/l de albúmina bovina, y en "estado sucio", es decir, en una solución de agua que contiene 3,0 g/l de albúmina bovina y 0,3 ml de eritrocitos.

30 Se preparan suspensiones que contienen *Adenovirus tipo 5 (ATCC VR5)* y *cepa de Poliovirus 1 Sabin* con un título, evaluado como Log<sub>10</sub> de ID<sub>50</sub>, respectivamente, de 5 5-8,15 para el *Adenovirus tipo 5* y 1-8,20 para la cepa de *Poliovirus 1 Sabin*, y con una relación de dilución diferente comprendida entre 0 (suspensión no diluida) y 10, entrando en contacto dichas suspensiones con capas de células HeLa aproximadamente al 90%, habiéndose cultivado dichas células en MEM con el 2% de FBC, para evaluar la concentración viral máxima que no provoca una mutación morfológica en las células.

35 Una concentración máxima de este tipo es 10<sup>-1</sup>. Por lo tanto, en los ensayos se usan suspensiones no diluidas de virus.

Las suspensiones virales y "Bactercline ulcer" se mantienen en contacto a una temperatura aproximada de 20 °C durante intervalos de tiempo predeterminados: 1 minuto, 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos.

40 Después de cada uno de dichos intervalos de tiempo, se retira una cantidad determinada de la mezcla que contiene la suspensión viral y "Bactercline ulcer", diluyéndose usando una relación de dilución de 1:10 con un medio esencial mínimo (MEM) y el 2% de suero de ternera fetal (FCS) para bloquear la actividad antiviral y analizándose a continuación para evaluar la actividad antiviral de "Bactercline ulcer".

Se evalúa la actividad antiviral calculando la ID<sub>50</sub>, es decir, la dilución de la suspensión viral que provoca efectos

citopáticos en el 50% de las muestras, según el “método Spearman-Kärber”.

Los resultados de los ensayos se muestran en las siguientes **Tabla 12** y **Tabla 13** para la suspensión de Poliovirus y Adenovirus 5, respectivamente.

**Tabla 12**

Tiempo contacto	Título viral “sucio”	Título viral “limpio”
60 min	-1,8	-1,0
30 min	-3,0	-2,0
10 min	-4,0	-3,0
1 min	-5,5	-5,0

5

**Tabla 13**

Tiempo contacto	Título viral “sucio”	Título viral “limpio”
60 min	-1,0	-1,0
30 min	-2,0	-1,5
10 min	-3,5	-2,5
1 min	-5,0	-4,5

Los valores en la segunda y tercera columnas de las tablas 12, 13 mencionadas anteriormente indican el logaritmo negativo del 50% del punto extremo.

10 Los resultados obtenidos muestran que se ha obtenido una reducción superior a  $4\text{Log}_{10}$  del título viral de las suspensiones en contacto con "Bactercline ulcer", en ambas suspensiones virales, en estado "limpio" y "sucio", con muestras con un intervalo de tiempo de contacto aproximadamente de 10 minutos.

Por lo tanto, se demuestra una elevada actividad antiviral de "Bactercline acne".

15 La metodología de estos ensayos se ha verificado para validar los resultados obtenidos. Dicha validación ha resultado positiva.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende nanopartículas, teniendo dicha composición la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$ , para obtener un producto de tratamiento tópico para tratar enfermedades de acné, siendo  $AO_x$  un óxido metálico o metaloide, en el que x indica el número de átomos (O) de oxígeno ligados al átomo metálico (A), siendo  $Me^{n+}$   $Ag^+$ , en el que L es ácido 4-mercaptofenilborónico, siendo i el número de grupos  $(L-Me^{n+})$  ligados al óxido metálico  $AO_x$ .
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho producto de tratamiento tópico comprende al menos un compuesto que tiene propiedades antivirales y/o antibacterianas y/o antimicrobianas y/o antimicóticas.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho producto de tratamiento tópico comprende al menos un compuesto eficaz en el tratamiento al menos de uno de los siguientes microbios: *HSV-1 (virus del herpes simple-1)*, *Adenovirus*, *Poliovirus*, *Aviaria virus*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Salmonella enteritidis D1*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  comprende además al menos una sal de amonio cuaternario para mejorar las propiedades de dicho producto de tratamiento tópico.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicha composición que tiene la fórmula general  $AO_x-(L-Me^{n+})_i$  comprende además al menos una sal de cloruro de amonio, tal como cloruro de benzalconio.
- 20 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho producto de tratamiento tópico comprende un producto de crema y/o un producto de gel y/o un producto en polvo y/o un producto en emulsión y/o un producto en suspensión y/o un producto de microesferas y/o un producto granular y/o un producto en emulsión múltiple y/o un producto en emulsión de agua-en aceite-en agua.
- 25 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho producto de tratamiento tópico es un producto de tratamiento tópico de cuidado de la piel y comprende una crema de día y/o una crema de noche y/o una crema limpiadora y/o un gel limpiador y/o una crema hidratante y/o una crema antiarrugas y/o una crema solar.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende al menos un componente antibacteriano.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende además al menos un componente antiviral.
- 30 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende además al menos un componente antimicótico.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende además al menos un componente antimicrobiano.
- 35 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que  $AO_x$  es un óxido seleccionado de un grupo que comprende sílice coloidal, dióxido de titanio, dióxido de zirconio, dióxido de estaño y óxido de zinc.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende además un tensioactivo catiónico ligado a dicho ligando L.
- 40 14. Uso según la reivindicación 13, en el que dicho tensioactivo catiónico se selecciona de un grupo que comprende sales de alquilamonio, tal como compuestos de amonio cuaternario, bencilo  $C_{12}-C_{14}$ , cloruro de alquilamonio- $C_1$ , cloruro de benzalconio.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho producto de tratamiento tópico comprende además aditivos y/o principio activo y/o excipientes adecuados para obtener un producto dermatológico.

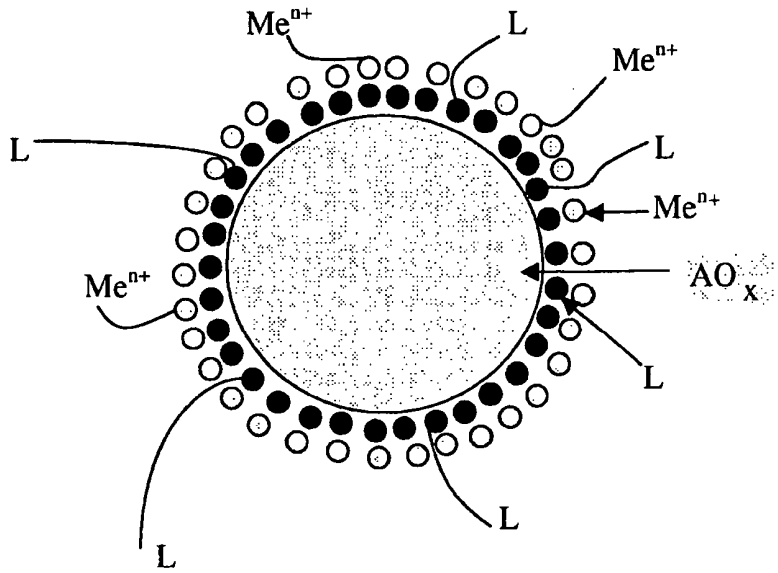


Fig. 1

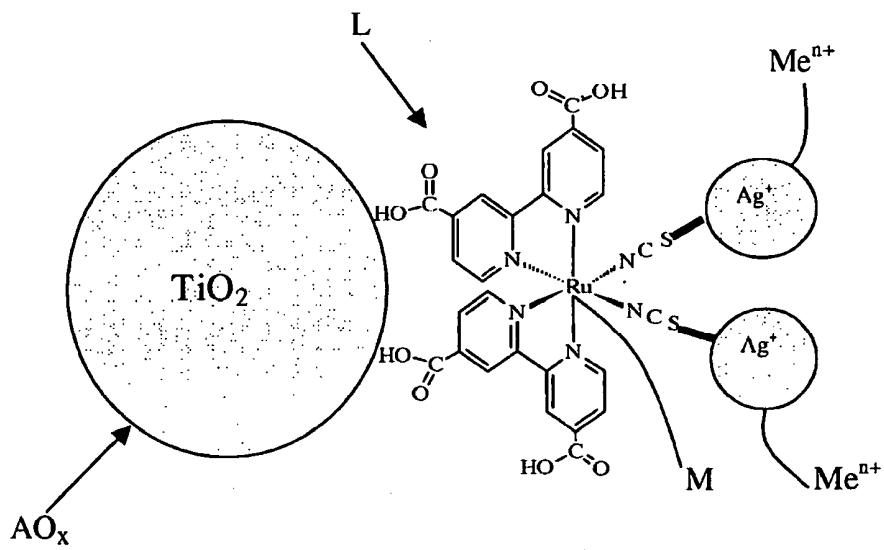


Fig. 2