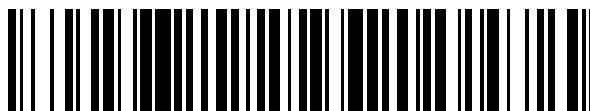


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 512**

51 Int. Cl.:

A01N 43/80 (2006.01)
A01N 59/16 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A61K 31/425 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2007 E 17171739 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3262941**

54 Título: **Biocidas de isotiazolinona mejorados con iones de zinc**

30 Prioridad:

26.05.2006 US 808697 P
24.05.2007 US 805779

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2019

73 Titular/es:

ARCH CHEMICALS, INC. (100.0%)
90 Boroline Road, Allendale
NJ 07401, US

72 Inventor/es:

THOMPSON, NICHOLAS EDWARD;
CLARKE, FITZGERALD y
GREENHALGH, MALCOLM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 721 512 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

Biocidas de isotiazolinona mejorados con iones de zinc

Antecedentes de la invención

5 Se sabe que las isotiazolinonas, tales como la 1,2-benzisotiazolin-3-ona (también conocida como "BIT"), son agentes antimicrobianos eficaces. BIT, como se describe, por ejemplo, en formulaciones descritas en la patente europea EP 0 703 726, es ampliamente utilizada como agente bactericida en una variedad de aplicaciones. De manera ilustrativa, la publicación de patente británica GB2.230.190A describe una composición conservante que contiene BIT y un aducto de cloruro de zinc ("ZC" por sus siglas en inglés), junto con de 2,2'-ditiopiridina-1,1'-dióxido ("DTP"). El ejemplo 3 de la publicación '190A compara composiciones que contienen BIT más ZC más DTP contra un ejemplo de control que
10 contiene solo BIT más ZC. Los resultados proporcionados en el Ejemplo 3 y la Tabla 3 de la publicación indican que la inclusión de DTP permite un uso reducido de BIT en la composición. No obstante, los autores de la presente invención han descubierto que la cantidad de BIT (2,5 ppm) empleada en el ejemplo de control es insuficiente para la eficacia antimicrobiana en aplicaciones del mundo real. El conservante Proxel BZ es un producto que comprende BIT y zinc piritiona.

15 Si bien se ha demostrado que BIT es útil en una amplia gama de aplicaciones, la cantidad útil de BIT que se puede añadir a un producto comercial está limitada por consideraciones económicas y de eficacia y, en menor medida, por cuestiones ambientales y toxicológicas. Por consiguiente, se necesitan composiciones antimicrobianas alternativas para aplicaciones en estado húmedo que sean rentables y minimizan la probabilidad de efectos ambientales y toxicológicos adversos. La presente invención proporciona una de tales alternativas.

20 Compendio de la invención

La presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de zinc seleccionado del grupo que consiste en cloruro de zinc, sulfuro de zinc, carbonato de zinc, carbonato básico de zinc, óxidos de zinc e hidróxidos de zinc y combinaciones de los mismos para mejorar la eficacia de una composición antimicrobiana, comprendiendo la composición antimicrobiana 1,2-benzisotiazolin-3-ona en una cantidad de 5 a 500 ppm, en donde el compuesto de
25 zinc está presente en una cantidad de 5 a 500 ppm, y la razón en peso de la 1,2-benzisotiazolin-3-ona con respecto al compuesto de zinc es de 1:100 a 100:1.

En un aspecto, la composición antimicrobiana es un fluido funcional.

30 El medio base para el fluido funcional puede ser, por ejemplo, un polímero útil en emulsiones poliméricas. Los ejemplos de sistemas poliméricos son redes, tales como (met)acrilatos acrílicos y sustituidos, estireno/butadieno, etilen vinil acetato, poli(acetato de vinilo), estireno/butadieno/N-metilol acrilamida, nitrilo y copolímeros de los mencionados anteriormente. Los fluidos funcionales típicos incluyen composiciones de recubrimiento, tales como pinturas, adhesivos, selladores, masillas, lechadas minerales y de pigmentos, tintas de impresión, formulaciones de plaguicidas agrícolas, productos para el hogar, cuidado personal, fluidos para trabajar metales y otros sistemas de base acuosa.

Estos y otros aspectos se harán evidentes al leer la siguiente descripción detallada de la invención.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona una representación gráfica de un isoblograma que muestra la actividad antimicrobiana de mezclas de 1,2-benzisotiazolin-3-ona ("BIT") y cloruro de zinc contra *Ps.aeruginosa* basado en valores de Concentración Inhibidora Fraccionada.

40 La Figura 2 proporciona una representación gráfica de un isoblograma que muestra la actividad antimicrobiana de las mezclas de Kathon® (una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona ("CIMIT") y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona ("MIT") y cloruro de zinc contra *Ps. aeruginosa* basado en valores de Concentración Inhibidora Fraccionada.

La Figura 3 proporciona una representación gráfica de un isoblograma que muestra la actividad antimicrobiana de mezclas de MIT y cloruro de zinc contra *Ps. aeruginosa* basado en valores de Concentración Inhibidora Fraccionada.

45 La Figura 4 proporciona una representación gráfica de un isoblograma que muestra la actividad antimicrobiana de mezclas de N-(n-butil)-1,2-benzisotiazolin-3-ona ("BBIT") y cloruro de zinc contra *Ps. aeruginosa* basado en valores de Concentración Inhibidora Fraccionada.

La Figura 5 proporciona una representación gráfica de un isoblograma que muestra la actividad antimicrobiana de mezclas de BIT y cloruro de sodio contra *Ps. aeruginosa* basado en valores de Concentración Inhibidora Fraccionada.

Descripción detallada de la invención

50 Se ha descubierto ahora sorprendentemente que una composición antimicrobiana que contiene BIT, más un compuesto de zinc seleccionado del grupo que consiste en sales de zinc, óxidos de zinc, hidróxidos de zinc, y combinaciones de los mismos, muestra una eficacia antimicrobiana mejorada, en comparación con las composiciones

que contienen isotiazolina que no contienen el compuesto metálico. La eficacia mejorada se proporciona adecuadamente en composiciones antimicrobianas en un amplio intervalo de pH de 3 a 12.

5 La composición antimicrobiana se puede incorporar adecuadamente a un fluido funcional. El fluido funcional comprende adecuadamente un medio de base más la composición antimicrobiana descrita anteriormente. Las sales de zinc ilustrativas incluyen cloruro de zinc, sulfuro de zinc, carbonato de zinc, carbonato básico de zinc (también conocido como "carbonato de zinc que contiene hidroxilo", también conocido como "hidroxicarbonato de zinc", que se identifica adicionalmente por la fórmula empírica $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2$), y combinaciones de los mismos.

En la composición, BIT está presente en una cantidad de 5 a 500 ppm, el compuesto de zinc está presente en una cantidad de 5 a 500 ppm, y la razón en peso de BIT con respecto al compuesto de zinc es de 100:1 a 1:100.

10 Las composiciones antimicrobianas se utilizan adecuadamente en fluidos funcionales tales como emulsiones poliméricas, u otras composiciones de recubrimiento, para conferir conservación tanto en estado húmedo como en lámina seca. El medio base puede ser, por ejemplo, un polímero útil en emulsiones poliméricas en donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en (met)acrilatos acrílicos y sustituidos, estireno/butadieno, etilenvinilacetato, poli(acetato de vinilo), estireno/butadieno/N-Metilol acrilamida, nitrilo y copolímeros de los mencionados anteriormente.
15 Los fluidos funcionales típicos incluyen composiciones de recubrimiento, tales como pinturas, adhesivos, selladores, masillas, lechadas minerales y de pigmentos, tintas de impresión, formulaciones de plaguicidas agrícolas, productos para el hogar, cuidado personal, fluidos para trabajar metales y otros sistemas de base acuosa.

20 La invención se describe adicionalmente en los ejemplos que se proporcionan a continuación. Todos los porcentajes proporcionados en la presente memoria son porcentajes en peso basados en el peso total de la composición, a menos que se indique lo contrario. Un ejemplo comparativo no está de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1

En este ejemplo, se sensibilizaron muestras de un látex acrílico con una base acuosa comercial, marca registrada REVACRYL 1A, suministrada por Harlow Chemical Company, pH 8,1, que contenía aditivos antimicrobianos en las cantidades identificadas en la Tabla I a continuación, a una suspensión bacteriana que consistía en

25 *Pseudomonas aeruginosa*, NCIMB 8295

Providencia rettgeri, NCIMB 10842

Serratia marcescens, NCIMB 9523

Aeromonas hydrophila, NCIMB9233

Alcaligenes spp. (producto aislado de conservación en estado húmedo)

30 *Burkholderia cepacia*, ATCC 25416

Pseudomonas putida, NCIMB9494

35 Todas las especies de prueba se cultivaron en agar nutriente y se incubaron durante 24 horas a 30°C. Después de este período, se prepararon suspensiones individuales de cada organismo de prueba a una concentración de 10^6 unidades de formación de colonias por ml en solución salina por medio de una cámara de conteo Thoma, lograda mezclando volúmenes iguales de las suspensiones individuales. La concentración de bacterias en cada alícuota después de cada sensibilización fue de 2×10^6 por ml.

40 Las muestras de pintura que contenían aditivos antimicrobianos se almacenaron a 40°C durante 7 días antes de comenzar la prueba. Las muestras de pintura se sensibilizaron con 1% v/v de suspensión bacteriana como se describe anteriormente. Todas las muestras de prueba se incubaron a 30°C durante la duración de la prueba y se examinaron para detectar bacterias viables después de 1, 3 y 7 días después de cada sensibilización. Las bacterias viables se detectaron por medio de alícuotas de aislamiento en agar nutriente seguido de incubación a 30°C durante 2 días.

La tabla I presenta los resultados obtenidos después de la tercera inoculación los días 1, 3 y 7.

ES 2 721 512 T3

Tabla I

Muestra	3° inoculación			
	BIT/ppm	Día 1	Día 3	Día 7
BIT/ZnO	50	C	C	C
	100	1+(92)	1+(27)	-
	150	1+ (95)	S (7)	-
	200	S (10)	T (4)	-
	250	1+ (89)	1+ (22)	-
	300	1+ (77)	1+ (12)	-
BIT/ZnCl2	50	C	C	C
	100	++	1+ (30)	-
	150	1+ (34)	1+ (21)	-
	200	1+ (51)	1+ (14)	-
	250	++(185)	1+ (25)	-
	300	1+ (58)	1+ (17)	-
PROXEL BD20	50	C	C	C
	100	C	C	C
	150	C	C	C
	200	C	C	C
	250	1+ (75)	-	-
	300	1+ (54)	-	-
	400	1+ (47)	-	-
<p>Las evaluaciones se califican como:</p> <p>- no se detectó crecimiento +++ crecimiento fuerte - colonias coalescentes completamente visibles</p> <p>T 0-5 colonias presentes C crecimiento fuerte confluyente</p> <p>S 5-10 colonias</p> <p>1+ 20-100 colonias</p> <p>+ crecimiento ligero - no hay un número especificado de colonias</p> <p>++ crecimiento moderado - colonias visibles, algo de coalescencia</p>				

Los resultados demuestran un efecto potenciador de BIT combinado con una sal que contiene zinc cuando se compara con un producto comercial, a saber, PROXEL BD20, un producto de Arch Chemicals, Inc. que contiene solo BIT para la conservación de un látex comercial ya que solamente se requieren 100 ppm de BIT en presencia de una sal que

contiene zinc en comparación con 250 ppm de BIT para muestras que contiene solamente BIT.

Ejemplo 2

Investigación de la potenciación entre 1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BIT) y Cloruro de Zinc ($ZnCl_2$) contra *Pseudomonas aeruginosa*.

5 Bacteria

Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (NCIB 10421) mantenida en agar nutriente, para estudiar la sinergia entre BIT y $ZnCl_2$.

Cálculo de Concentraciones Inhibidoras Mínimas contra Monocultivos

10 Las bacterias se cultivaron hasta la fase estacionaria (aproximadamente 24 horas) en caldo nutriente (aproximadamente 10^9 organismos por ml). Se utilizó un inóculo al 0,1% (v/v) para sembrar medio de nueva aportación y a continuación se añadieron 100 μ l del inóculo a cada pocillo de una placa de microtitulación, excepto el primer pocillo que contenía 200 μ l.

15 Utilizando diluciones dobles, la concentración de los compuestos bajo investigación se varió en cada pocillo a lo largo del eje de ordenadas. La presencia o ausencia de crecimiento se registró mediante inspección visual después de 24 horas de incubación a 37°C.

Cálculo de la Actividad Antimicrobiana contra Monocultivos

20 Para este ensayo se utilizaron placas de microtitulación. Se construyó una matriz simple con concentraciones variadas de los dos compuestos, desde 2 x CIM (concentración inhibidora mínima) hasta una concentración cero en una matriz de 10 x 10. Como la placa de microtitulación tiene solo 96 pocillos, se omitieron las combinaciones de los dos compuestos que componían las concentraciones extremas (la más alta y la más baja). Las soluciones se prepararon en caldo a dos veces las concentraciones finales después de la disolución previa de los compuestos en agua destilada.

La mezcla (100 μ l) se añadió a la placa para que el volumen total en cada pocillo fuera de 200 μ l. Se utilizó caldo nutriente para *Ps.aeruginosa*. Las placas se incubaron durante 16-24 horas a 37°C. La presencia o ausencia de crecimiento se determinó mediante inspección visual.

25 Resultados para el Ejemplo 2

Tabla 2: Actividad Antimicrobiana de Compuestos Bajo Investigación

Tabla 2

COMPUESTO	CIM (ppm) contra <i>Ps.aeruginosa</i>			
	1	2	3	4
BIT	30	42	42	30
$ZnCl_2$	300	450	375	450
BIT es 1,2-benzisotiazolin-3-ona disponible de Arch Limited PROXEL® GXL.				

Cálculo de Actividad contra Monocultivos.

30 La Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la concentración más baja de biocida que mostró inhibición del crecimiento cuando se utilizó solo. Para el propósito de los cálculos de Concentración Inhibidora Fraccionada (CIF), si un solo biocida no controlaba el crecimiento, se tomaba la CIM como la concentración más alta utilizada. Una Concentración Inhibidora Fraccionada es la concentración de biocida que controla el crecimiento en la mezcla dividida por la CIM de ese biocida. Se calcularon los valores de CIF para ambos compuestos en la mezcla y los resultados se muestran en la Tabla 3. La suma de estas dos cifras proporciona una indicación de la acción de los dos biocidas. Un valor menor que uno indica un efecto mejorado, si el total es la unidad o mayor, la acción es aditiva y si el valor es mayor que dos, los biocidas son antagonicos.

35

Tabla 3: Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas para 1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BIT) y Cloruro de Zinc (ZnCl₂) contra *Ps.aeruginosa*

Tabla 3

COMPUESTO	VALORES CIF												
	1			2					3	4			
BIT	1	0,20	0,20	0,40	0,14	0,14	0,29	0,29	0,43	0,14	0,20	0,40	0
ZnCl ₂	0	0,25	0,50	0,25	0,33	0,50	0,17	0,33	0,17	0,60	0,33	0,17	1
Total	1	0,45	0,70	0,65	0,47	0,64	0,46	0,62	0,60	0,74	0,53	0,57	1

- 5 Si se construye una gráfica con los ejes que representan las Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas del biocida para los dos biocidas en escalas lineales, cuando la combinación es aditiva, el isobolo (es decir, la línea que une los puntos que representan todas las combinaciones con el mismo efecto, incluidas las concentraciones igualmente eficaces de los biocidas utilizados solos) es recto, las combinaciones mejoradas proporcionan isobolos cóncavos y las combinaciones antagónicas proporcionan isobolos convexos. Como se muestra en la FIG. 1, la combinación de BIT y ZnCl₂ tiene un efecto mejorado contra *Ps.aeruginosa* según lo confirmado por el isobolo cóncavo en el gráfico de la FIG.1.

Ejemplo Comparativo 3

Investigación de potenciación entre Kathon® (CIMIT/MIT) y Cloruro de Zinc (ZnCl₂) contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacteria

- 15 Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (NCIB 10421) mantenida en agar nutriente, para estudiar la sinergia de Kathon® y ZnCl₂.

Cálculo de Concentraciones Inhibidoras Mínimas Contra Monocultivos

- 20 Las bacterias se cultivaron hasta la fase estacionaria (aproximadamente 24 horas) en caldo nutriente (aproximadamente 10⁹ organismos por ml). Se utilizó un inóculo al 0,1% (v/v) para sembrar medio de nueva aportación y a continuación se añadieron 100 µl del inóculo a cada pocillo de una placa de microtitulación, excepto el primer pocillo que contenía 200 µl.

Utilizando diluciones dobles, la concentración de los compuestos bajo investigación se varió en cada pocillo a lo largo del eje de ordenadas. La presencia o ausencia de crecimiento se registró mediante inspección visual después de 24 horas de incubación a 37°C.

- 25 Cálculo de la Actividad Antimicrobiana Contra Monocultivos

- 30 Para este ensayo se utilizaron placas de microtitulación. Se construyó una matriz simple con concentraciones variadas de los dos compuestos, desde 2 x CIM (concentración inhibidora mínima) hasta una concentración cero en una matriz de 10 x 10. Como la placa de microtitulación tiene solo 96 pocillos, se omitieron las combinaciones de los dos compuestos que componían las concentraciones extremas (la más alta y la más baja). Las soluciones se prepararon en caldo a dos veces las concentraciones finales después de la disolución previa de los compuestos en agua destilada.

La mezcla (100 µl) se añadió a la placa para que el volumen total en cada pocillo fuera de 200 µl. Se utilizó caldo nutriente para *Ps.aeruginosa*. Las placas se incubaron durante 16-24 horas a 37°C. La presencia o ausencia de crecimiento se determinó mediante inspección visual.

Resultados del Ejemplo Comparativo 3

- 35 Tabla 4: Actividad Antimicrobiana de Compuestos Bajo Investigación

Tabla 4

COMPUESTO	CIM (ppm) contra <i>Ps.aeruginosa</i>			
	1	2	3	4
Kathon	0,9	0,9	0,9	0,53
ZnCl ₂	294	294	210	600

La mezcla de CIMIT y MIT está disponible en Rohm and Haas Company, Filadelfia, PA marca registrada Kathon®.

Cálculo de Sinergia Contra Monocultivos.

- 5 La Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la concentración más baja de biocida que mostró inhibición del crecimiento cuando se utilizó solo. Para el propósito de los cálculos de Concentración Inhibidora Fraccionada (CIF), si un solo biocida no controlaba el crecimiento, se tomaba la CIM como la concentración más alta utilizada. Una concentración inhibidora fraccionada es la concentración de biocida que controla el crecimiento en la mezcla dividida por la CIM de ese biocida. Se calcularon los valores de CIF para ambos compuestos en la mezcla y los resultados se muestran en la Tabla 5. La suma de estas dos cifras proporciona una indicación de la acción de los dos biocidas. Un valor menor que uno indica un efecto mejorado, si el total es la unidad o mayor, la acción es aditiva y si el valor es mayor que dos, los biocidas son antagonistas.

Tabla 5: Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas para Kathon (CIMIT/MIT) y Cloruro de Zinc (ZnCl₂) contra *Ps.aeruginosa*

15

Tabla 5

COMPUESTO	VALORES CIF											
		1		2		3			4			
Kathon	1	0,17	0,17	0,33	0,33	0,17	0,33	0,33	0,14	0,28	0,28	0
ZnCl ₂	0	0,14	0,29	0,14	0,29	0,29	0,14	0,29	0,50	0,38	0,50	1
Total	1	0,31	0,46	0,47	0,62	0,46	0,47	0,62	0,64	0,66	0,78	1

- 20 Si se construye una gráfica con los ejes que representan las Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas del biocida para los dos biocidas en escalas lineales, cuando la combinación es aditiva, el isobolo (es decir, la línea que une los puntos que representan todas las combinaciones con el mismo efecto, incluidas las concentraciones igualmente eficaces de los biocidas utilizados solos) es recto, las combinaciones mejoradas proporcionan isobolos cóncavos y las combinaciones antagonistas proporcionan isobolos convexos. Como se muestra en la FIG. 2, la combinación de Kathon® y ZnCl₂ tiene un efecto mejorado contra *Ps. aeruginosa* según lo confirmado por el isobolo cóncavo en la FIG. 2.

Ejemplo Comparativo 4

- 25 Investigación de la potenciación entre MIT y Cloruro de Zinc (ZnCl₂) contra *Pseudomonas aeruginosa*

Bacteria

Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (NCIB 10421) mantenida en agar nutriente, para estudiar la sinergia entre MIT y ZnCl₂.

Cálculo de Concentraciones Inhibidoras Mínimas Contra Monocultivos

- 30 Las bacterias se cultivaron hasta la fase estacionaria (aproximadamente 24 horas) en caldo nutriente (aproximadamente 10⁹ organismos por ml). Se utilizó un inóculo al 0,1% (v/v) para sembrar medio de nueva aportación y a continuación se añadieron 100 µl del inóculo a cada pocillo de una placa de microtitulación, excepto el primer pocillo que contenía 200 µl.

Utilizando diluciones dobles, la concentración de los compuestos bajo investigación se varió en cada pocillo a lo largo

del eje de ordenadas. La presencia o ausencia de crecimiento se registró mediante inspección visual después de 24 horas de incubación a 37 °C.

Cálculo de la Actividad Antimicrobiana Contra Monocultivos

5 Para este ensayo se utilizaron placas de microtitulación. Se construyó una matriz simple con concentraciones variadas de los dos compuestos, desde 2 x CIM (concentración inhibidora mínima) hasta una concentración cero en una matriz de 10 x 10. Como la placa de microtitulación tiene solo 96 pocillos, se omitieron las combinaciones de los dos compuestos que componían las concentraciones extremas (la más alta y la más baja). Las soluciones se prepararon en caldo a dos veces las concentraciones finales después de la disolución previa de los compuestos en agua destilada.

10 La mezcla (100 µl) se añadió a la placa para que el volumen total en cada pocillo fuera de 200 µl. Se utilizó caldo nutriente para *Ps.aeruginosa*. Las placas se incubaron durante 16-24 horas a 37°C. La presencia o ausencia de crecimiento se determinó mediante inspección visual.

Resultados del Ejemplo Comparativo 4

Tabla 6: Actividad Antimicrobiana de Compuestos Bajo Investigación

Tabla 6

COMPUESTO	CIM (ppm) contra <i>Ps.aeruginosa</i>			
	1	2	3	4
MIT	9	6	10,5	8
ZnCl ₂	210	210	450	450

15

Cálculo de Sinergia Contra Monocultivos.

La Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la concentración más baja de biocida que mostró inhibición del crecimiento cuando se usa solo. Para el propósito de los cálculos de Concentración Inhibidora Fraccionada (CIF), si un solo biocida no controlaba el crecimiento, se tomaba la CIM como la concentración más alta utilizada. Una concentración inhibidora fraccionada es la concentración de biocida que controla el crecimiento en la mezcla dividida por la CIM de ese biocida. Se calcularon los valores de CIF para ambos compuestos en la mezcla y los resultados se muestran en la Tabla 7. La suma de estas dos cifras proporciona una indicación de la acción de los dos biocidas. Un valor menor que uno indica un efecto mejorado, si el total es la unidad o mayor, la acción es aditiva y si el valor es mayor que dos, los biocidas son antagonistas.

25 Tabla 7: Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas para (MIT) y Cloruro de Zinc (ZnCl₂) contra *Ps.aeruginosa*

Tabla 7

COMPUESTO	Valores CIF											
		1				2				3		4
MIT	1	0,17	0,33	0,33	0,50	0,25	0,50	0,75	0,14	0,29	0,17	0
ZnCl ₂	0	0,57	0,29	0,43	0,14	0,43	0,29	0,14	0,33	0,17	0,50	1
Total	1	0,74	0,62	0,76	0,64	0,68	0,79	0,89	0,48	0,46	0,67	1

30 Si se construye una gráfica con los ejes que representan las Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas del biocida para los dos biocidas en escalas lineales, cuando la combinación es aditiva, el isobolo (es decir, la línea que une los puntos que representan todas las combinaciones con el mismo efecto, incluidas las concentraciones igualmente efectivas de los biocidas utilizados solos) es recto, las combinaciones mejoradas proporcionan isobolos cóncavos y las combinaciones antagonistas proporcionan isobolos convexos. Como se muestra en la FIG. 3, la combinación de MIT y ZnCl₂ tiene un efecto mejorado contra *Ps.aeruginosa* confirmado por el isobolo cóncavo en la FIG. 3.

Ejemplo Comparativo 5

Investigación de potenciación entre BBIT y Cloruro de Zinc ($ZnCl_2$) contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacteria

5 Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (NCIB 10421) mantenida en agar nutriente, para estudiar la sinergia entre BBIT y $ZnCl_2$.

Cálculo de Concentraciones Inhibidoras Mínimas Contra Monocultivos

10 Las bacterias se cultivaron hasta la fase estacionaria (aproximadamente 24 horas) en caldo nutriente (aproximadamente 10^9 organismos por ml). Se utilizó un inóculo al 0,1% (v/v) para sembrar medio de nueva aportación y a continuación se añadieron 100 μ l del inóculo a cada pocillo de una placa de microtitulación, excepto el primer pocillo que contenía 200 μ l.

Utilizando diluciones dobles, la concentración de los compuestos bajo investigación se varió en cada pocillo a lo largo del eje de ordenadas. La presencia o ausencia de crecimiento se registró mediante inspección visual después de 24 horas de incubación a 37°C.

Cálculo de la Actividad Antimicrobiana Contra Monocultivos

15 Para este ensayo se utilizaron placas de microtitulación. Se construyó una matriz simple con concentraciones variadas de los dos compuestos, desde 2 x CIM (concentración inhibidora mínima) hasta una concentración cero en una matriz de 10 x 10. Como la placa de microtitulación tiene solo 96 pocillos, se omitieron las combinaciones de los dos compuestos que componían las concentraciones extremas (la más alta y la más baja). Las soluciones se prepararon en caldo a dos veces las concentraciones finales después de la disolución previa de los compuestos en agua destilada.

20 La mezcla (100 μ l) se añadió a la placa para que el volumen total en cada pocillo fuera de 200 μ l. Se utilizó caldo nutriente para *Ps.aeruginosa*. Las placas se incubaron durante 16-24 horas a 37°C. La presencia o ausencia de crecimiento se determinó mediante inspección visual.

Resultados del Ejemplo Comparativo 5

Tabla 8: Actividad Antimicrobiana de Compuestos Bajo Investigación

25 Tabla 8

COMPUESTO	CIM (ppm) contra <i>Ps.aeruginosa</i>			
	1	2	3	4
BBIT	315	360	42	180
$ZnCl_2$	525	525	600	600

BBIT es N-(n-butil)-1,2-benzisotiazolin-3-ona.

Cálculo de Sinergia Contra Monocultivos.

30 La Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la concentración más baja de biocida que mostró inhibición del crecimiento cuando se utiliza solo. Para el propósito de los cálculos de Concentración Inhibidora Fraccionada (CIF), si un solo biocida no controlaba el crecimiento, se tomaba la CIM como la concentración más alta utilizada. Una concentración inhibidora fraccionada es la concentración de biocida que controla el crecimiento en la mezcla dividida por la CIM de ese biocida. Se calcularon los valores de CIF para ambos compuestos en la mezcla y los resultados se muestran en la Tabla 9. La suma de estas dos cifras proporciona una indicación de la acción de los dos biocidas. Un valor menor que uno indica un efecto mejorado, si el total es la unidad o mayor, la acción es aditiva y si el valor es mayor que dos, los biocidas son antagonicos.

35

Tabla 9: Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas para BBIT y Cloruro de Zinc (ZnCl₂) contra *Ps.aeruginosa*

Tabla 9

COMPUESTO	Valores CIF						
		1	2	3		4	
BBIT	1	0,29	0,25	0,14	0,71	0,25	0
ZnCl ₂	0	0,43	0,43	0,50	0,38	0,38	1
Total	1	0,71	0,68	0,64	1,09	0,63	1

5 Si se construye una gráfica con los ejes que representan las Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas del biocida para los dos biocidas en escalas lineales, cuando la combinación es aditiva, el isobolo (es decir, la línea que une los puntos que representan todas las combinaciones con el mismo efecto, incluidas las concentraciones igualmente efectivas de los biocidas utilizados solos) es recto, las combinaciones mejoradas proporcionan isobolos cóncavos y las combinaciones antagónicas proporcionan isobolos convexos. Como se muestra en la FIG. 4, la combinación de BBIT y ZnCl₂ tiene un efecto mejorado contra *Ps.aeruginosa* según lo confirmado por el isobolo cóncavo mostrado en la FIG. 4.

Ejemplo comparativo A

Investigación de la potenciación entre 1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BIT) y Cloruro de Sodio (NaCl₂) contra *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con la sinergia entre 1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BIT) y Cloruro de Zinc (ZnCl₂) contra *Pseudomonas aeruginosa* (Ejemplo 2)

15 Bacteria

Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (NCIB 10421) mantenida en agar nutriente, para estudiar la eficacia de la combinación de BIT con cloruro de sodio.

Cálculo de Concentraciones Inhibidoras Mínimas Contra Monocultivos

20 Las bacterias se cultivaron hasta la fase estacionaria (aproximadamente 24 horas) en caldo nutriente (aproximadamente 10⁹ organismos por ml). Se utilizó un inóculo al 0,1% (v/v) para sembrar medio de nueva aportación y a continuación se añadieron 100 µl del inóculo a cada pocillo de una placa de microtitulación, excepto el primer pocillo que contenía 200 µl.

25 Utilizando diluciones dobles, la concentración de los compuestos bajo investigación se varió en cada pocillo a lo largo del eje de ordenadas. La presencia o ausencia de crecimiento se registró mediante inspección visual después de 24 horas de incubación a 37°C.

Cálculo de la Actividad Antimicrobiana Contra Monocultivos

30 Para este ensayo se utilizaron placas de microtitulación. Se construyó una matriz simple con concentraciones variadas de los dos compuestos, desde 2 x CIM (concentración inhibidora mínima) hasta una concentración cero en una matriz de 10 x 10. Como la placa de microtitulación tiene solo 96 pocillos, se omitieron las combinaciones de los dos compuestos que componían las concentraciones extremas (la más alta y la más baja). Las soluciones se prepararon en caldo a dos veces las concentraciones finales después de la disolución previa de los compuestos en agua destilada.

La mezcla (100 µl) se añadió a la placa para que el volumen total en cada pocillo fuera de 200 µl. Se utilizó caldo nutriente para *Ps.aeruginosa*. Las placas se incubaron durante 16-24 horas a 37°C. La presencia o ausencia de crecimiento se determinó mediante inspección visual.

35 Resultados del Ejemplo Comparativo A

Tabla 10: Actividad Antimicrobiana de Compuestos Bajo Investigación

Tabla 10

COMPUESTO	CIM (ppm) contra <i>Ps.aeruginosa</i>
BIT	30
NaCl ₂	Ninguno detectado (mayor de 675)
BIT es 1,2-benzisotiazolin-3-ona disponible de Arch Limited como PROXEL ^{RTM} GXL.	

Cálculo de la potenciación contra Monocultivos.

5 La Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la concentración más baja de biocida que mostró inhibición del crecimiento cuando se usa solo. Para el propósito de los cálculos de Concentración Inhibidora Fraccionada (CIF), si un solo biocida no controlaba el crecimiento, se tomaba la CIM como la concentración más alta utilizada. Una concentración inhibidora fraccionada es la concentración de biocida que controla el crecimiento en la mezcla dividida por la CIM de ese biocida. Se calcularon los valores de CIF para ambos compuestos en la mezcla y los resultados se muestran en la Tabla 11. La suma de estas dos cifras proporciona una indicación de la acción de los dos biocidas. Un valor menor que uno indica un efecto mejorado, si el total es la unidad o mayor, la acción es aditiva y si el valor es mayor que dos, los biocidas son antagonistas.

10 Tabla 11: Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas para 1,2-Benzisotiazolin-3-ona (BIT) y Cloruro de Sodio (NaCl₂) contra *Ps.aeruginosa*

Tabla 11

COMPUESTO	VALORES CIF		
BIT	1	1,00	0
NaCl ₂	0	0,33	1
Total	1	1,33	1

15 Si se construye una gráfica con los ejes que representan las Concentraciones Inhibidoras Fraccionadas del biocida para los dos biocidas en escalas lineales, cuando la combinación es aditiva, el isobolo (es decir, la línea que une los puntos que representan todas las combinaciones con el mismo efecto, incluidas las concentraciones igualmente efectivas de los biocidas utilizados solos) es recto, las combinaciones mejoradas proporcionan isobolos cóncavos y las combinaciones antagonistas proporcionan isobolos convexos. Como se muestra en la FIG. 5, la combinación de BIT y NaCl₂ es aditiva contra *Ps.aeruginosa* según lo confirmado por el isobolo recto en la FIG. 5. Además, los resultados de este Ejemplo ilustran además que la combinación de una isotiazolin-3-ona tal como BIT y un compuesto de zinc tal como ZnCl₂, como se muestra en el Ejemplo 2, muestra resultados de potenciación inesperados contra *Ps.aeruginosa*.

25

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto de zinc seleccionado del grupo que consiste en cloruro de zinc, sulfuro de zinc, carbonato de zinc, carbonato básico de zinc, óxidos de zinc, hidróxidos de zinc y combinaciones de los mismos para mejorar la eficacia de una composición antimicrobiana, comprendiendo la composición antimicrobiana 1,2-benzisotiazolin-3-ona en una cantidad de 5 a 500 ppm, en donde el compuesto de zinc está presente en una cantidad de 5 a 500 ppm, y la razón en peso de 1,2-benzisotiazolin-3-ona con respecto al compuesto de zinc es de 1:100 a 100:1.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto de zinc es cloruro de zinc.

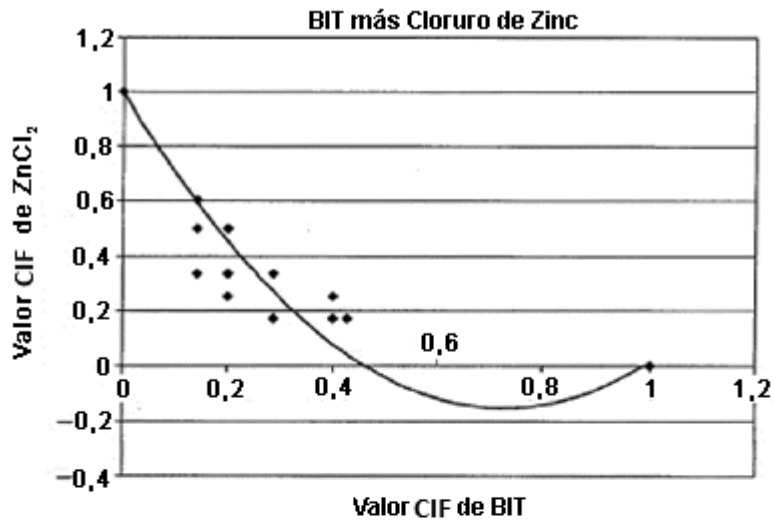


FIG. 1

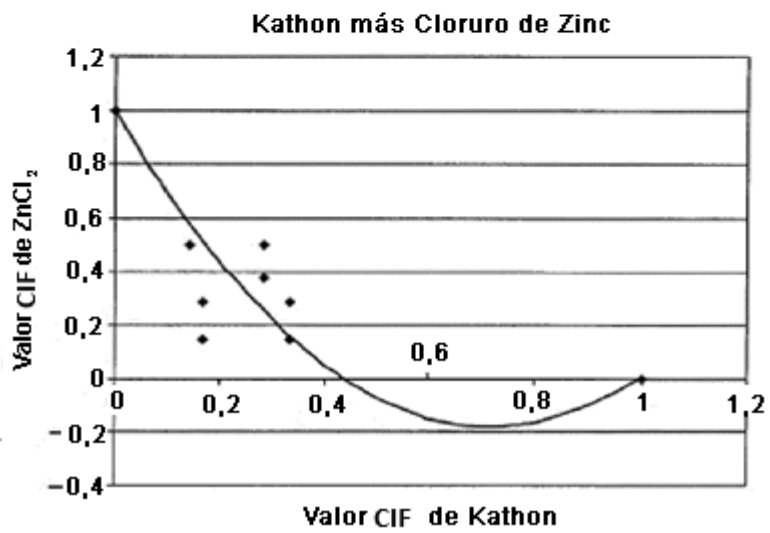


FIG. 2

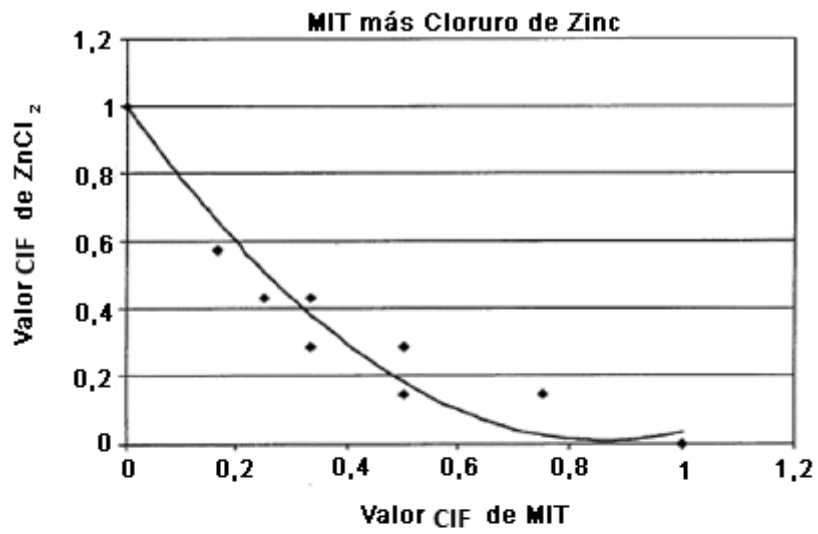


FIG.3

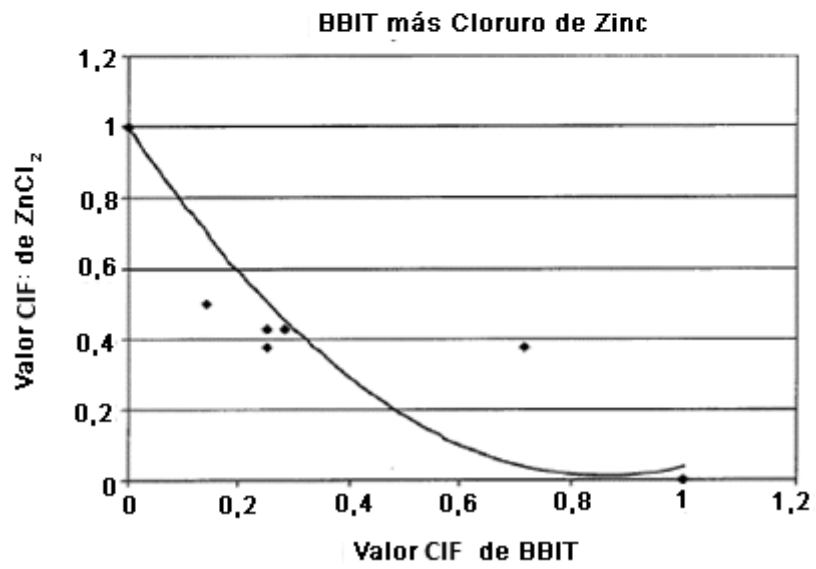


FIG.4

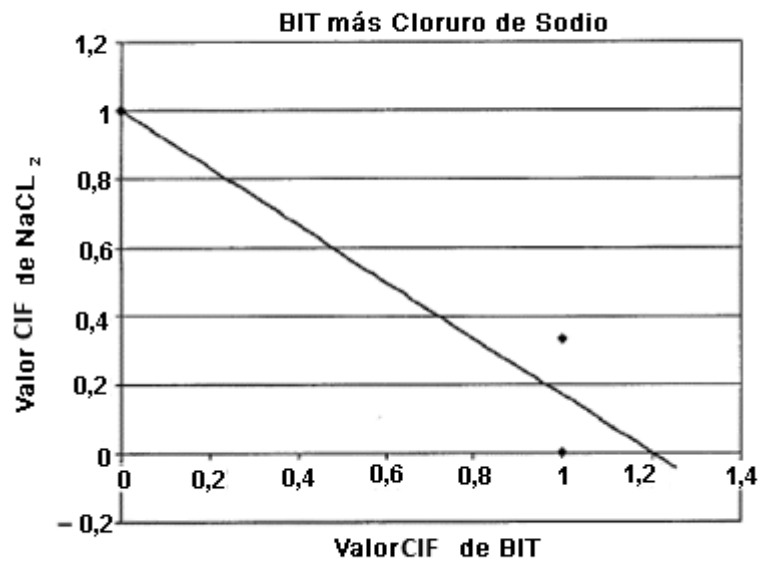


FIG.5