



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 168 054**

⑫ Número de solicitud: 200000358

⑬ Int. Cl.⁷: A61L 2/18

A01N 33/12

A01N 31/02

C11D 1/62

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑭ Fecha de presentación: **16.02.2000**

⑮ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2002**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.05.2002

⑰ Solicitante/s: **CARAMBA, S.L.**
Pol. Ind. Camposol, nave 19
30006 Puente Tocinos, Murcia, ES

⑱ Inventor/es: **García Alustiza, Juan Manuel**

⑲ Agente: **Urizar Anasagasti, Jesús María**

⑳ Título: **Composición desinfectante.**

㉑ Resumen:

Composición desinfectante.

La composición desinfectante comprende (i) un alcohol seleccionado del grupo formado por etanol, isopropanol y sus mezclas, en una cantidad comprendida entre el 92 % y el 99,6 % en peso respecto al total de la composición, (ii) sacarinato de alquil-dimetilbencilamonio, en una cantidad comprendida entre 0,3 % y 0,4 % en peso respecto al total de la composición, y, opcionalmente, (iii) trietilenglicol, en una cantidad comprendida entre 0 % y 7,6 % en peso respecto al total de la composición. La composición desinfectante, de amplio espectro, puede ser utilizada en el ámbito doméstico o industrial.

ES 2 168 054 A1

DESCRIPCION

Composición desinfectante.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a una composición desinfectante de amplio espectro que comprende un alcohol seleccionado entre etanol e isopropanol, sacarinato de alquildimetilbencilamonio y, opcionalmente, trietilenglicol. La composición desinfectante puede ser utilizada tanto en el ámbito doméstico como en el industrial.

10 Antecedentes de la invención

La desinfección consiste en la eliminación, destrucción o inactivación de microorganismos capaces de causar infecciones u otros efectos indeseables. Puede llevarse a cabo mediante el uso de agentes químicos o mediante procedimientos físicos, tales como calor, radiación ultravioleta, etc.

En general, el término desinfectante se aplica a cualquier sustancia química utilizada para la desinfección. Las sustancias de uso general deben ser activas frente a un amplio margen de patógenos comunes y comportarse como microbicidas a las concentraciones empleadas.

Entre los numerosos desinfectantes conocidos se encuentran los oxidantes (peróxido de hidrógeno, permanganato potásico); las bases (sosa cáustica); los alcoholes (etanol); los aldehídos (formaldehído, formol, glutaraldehído); derivados fenólicos (fenol, hexaclorofenol, cresoles, ácidos pícricos); halógenos (cloro, yodo); diguanidinas (clorhexidina); tensioactivos (sales de benzalconio); compuestos metálicos (sales de mercurio, compuestos de plata, sales cúpricas); compuestos organo-metálicos (mertiolato, mercurocromo); derivados de acridina y aceites esenciales de plantas (pino).

Aunque existen numerosos desinfectantes, sigue existiendo la necesidad de incrementar el arsenal de medios para desinfectar superficies. La invención proporciona una solución a la necesidad existente.

30 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una composición desinfectante de amplio espectro, en adelante, composición de la invención. que comprende (i) un alcohol seleccionado del grupo formado por etanol, isopropanol y sus mezclas, en una cantidad comprendida entre el 92 % y el 99,6 %. en peso respecto al total de la composición, (ii) sacarinato de alquildimetilbencilamonio, en una cantidad comprendida entre 0,3 % y 0,4 % en peso respecto al total de la composición, y, opcionalmente, (iii) trietilenglicol, en una cantidad comprendida entre 0 % y 7,6 % en peso respecto al total de la composición. La composición de la invención puede contener, además, uno o más excipientes.

El etanol y el isopropanol son antisépticos y desinfectantes conocidos; el sacarinato de alquildimetilbencilamonio es una sal de benzalconio con propiedades desinfectantes, y el trietilenglicol tiene menor actividad bactericida.

El componente (i) puede ser etanol, isopropanol o una mezcla binaria de etanol e isopropanol, en cualquier proporción. En una realización particular, el componente (i) es isopropanol. En otra realización particular, el componente (i) está formado por una mezcla de etanol e isopropanol en una relación ponderal 65:35 (etanol:isopropanol).

La composición de la invención también puede contener uno o más excipientes habitualmente utilizados en la formulación de composiciones desinfectantes, por ejemplo, estabilizantes, conservantes, aromas y colorantes.

En una realización particular, la composición de la invención presenta la siguiente formulación:

Isopropanol	99,6 %
Sacarinato de alquildimetilbencilamonio	0,4 %

donde todos los porcentajes son en peso respecto al total de la composición.

ES 2 168 054 A1

En otra realización particular, la composición de la invención presenta la siguiente formulación:

Isopropanol	92,25 %
Sacarinato de alquildimetilbencilamonio	0,37 %
Trietilenglicol	7,38 %

donde todos los porcentajes son en peso respecto al total de la composición.

En ambas formulaciones el isopropanol puede ser sustituido por una mezcla etanol:isopropanol en una relación 65:35 en peso.

La composición de la invención puede obtenerse fácilmente mediante la mezcla de los componentes de la misma, en las cantidades adecuadas, bajo agitación, hasta homogeneización total.

La composición de la invención puede ser utilizada como desinfectante de amplio espectro y está especialmente destinada para su empleo en cualquier ámbito, por ejemplo, doméstico o industrial, y, en general, en todos aquellos ámbitos que requieren de la desinfección de superficies, conductos, tuberías, equipos, etc.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para desinfectar una superficie que comprende aplicar la composición de la invención, en una cantidad desinfectante, sobre la superficie a desinfectar.

La composición de la invención puede ser aplicada por cualquier técnica convencional, por ejemplo, mediante inmersión en un baño que contiene la composición de la invención, o por pulverización, inyección o impregnación, con ayuda de un aplicador apropiado. En una realización particular, la composición de la invención se presenta en forma de un aerosol, para lo cual la composición de la invención se introduce en un envase apropiado y se carga el propelente, opcionalmente, junto con un aroma. En otra realización particular, la composición de la invención se utiliza para impregnar toallitas.

La composición de la invención puede utilizarse a concentraciones muy diluidas. Como disolvente de dilución puede utilizarse cualquier disolvente compatible con la composición de la invención y con los componentes que la forman, por ejemplo, agua.

La estabilidad de la composición de la invención puede incrementarse mediante la adición de estabilizantes o conservantes apropiados.

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biocida de la composición de la invención se puede afirmar que la composición de la invención ejerce un efecto sinérgico ya que la actividad de la composición de la invención es superior a la de sus componentes por separado. Así, ha resultado sorprendente comprobar que la combinación de isopropanol, sacarinato de alquildimetilbencilamonio, y trietilenglicol, rindiera los extraordinarios resultados que se recogen en los Ejemplos 2 y 3, que ponen de manifiesto que una composición desinfectante incluida dentro del ámbito de la composición de la invención aumenta su capacidad bactericida y fungicida (con respecto a los componentes por separado).

Los siguientes ejemplos constituyen realizaciones concretas e ilustrativas de esta invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Preparación de una composición desinfectante

Se preparó una composición desinfectante que contenía:

Isopropanol	92,25 %
Onyxide® 3300	0,37 %
Trietilenglicol	7,38 %

donde todos los porcentajes son en peso respecto al total de la composición.

ONYXIDE® 3300, es la marca comercial de un sacarinato de alquildimetilbencilamonio [número CAS 68989-01-5] comercializado por Millchem Ltd., R. Unido.

La composición se obtuvo mezclando las cantidades apropiadas de cada componente y agitando hasta homogeneización completa.

Ejemplo 2

Ensayos de eficacia de la composición desinfectante

La eficacia de la composición desinfectante descrita en el Ejemplo 1 se puso de manifiesto mediante la realización de los ensayos adecuados para determinar su actividad bactericida y fungicida.

Las normas aplicadas para la realización de dichos ensayos fueron las siguientes:

- Norma UNE-EN 1276: "Antisépticos y desinfectantes químicos: Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la *actividad bactericida* de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en la colectividad"; y
- Norma UNE-EN 1650: "Antisépticos y desinfectantes químicos: Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la *actividad fungicida* de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en la colectividad".

1. *Actividad bactericida*

Para evaluar la actividad bactericida de la composición desinfectante del Ejemplo 1 y de los compuestos que la forman, se aplicó la norma UNE-EN 1276, norma europea aprobada por el comité europeo de normalización al que pertenece AENOR [Asociación Española de Normalización y Certificación].

Esta norma es un método de ensayo de suspensión para determinar si un antiséptico o desinfectante químico tiene o no actividad bactericida en las condiciones de ensayo establecidas por la norma, tiempo de contacto 5 minutos a 20°C. Se considera que tiene actividad bactericida cuando la reducción del número de células bacterianas viables es del 99,999 %, 5 logaritmos, de las cepas dictadas por la norma: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae*.

La norma permite hacer el ensayo en condiciones limpias o sucias. En este caso, se han escogido las condiciones más extremas: condiciones sucias.

El método aplicado ha sido el de dilución-neutralización, para lo cual ha sido necesario encontrar un producto neutralizante de la actividad bactericida. El producto usado ha sido 5 % de Tween 80 y 1 % de lecitina. Si no se hubiera encontrado ese neutralizante, el método a aplicar hubiera sido el de filtración a través de membrana.

El ensayo requiere la validación de las condiciones experimentales, la validación de la no toxicidad del neutralizador y finalmente la validación del método de dilución-neutralización. Los resultados de estas validaciones se exponen en la misma tabla que los resultados del ensayo bactericida.

Se debe hacer una consideración respecto a los porcentajes de la composición ensayada. En las tablas se ha descrito la concentración de la composición ensayada antes de ponerla en contacto con el interferente y las células del ensayo. En la norma no queda claro si realmente es este porcentaje el que se debe considerar o si se ha de considerar la dilución final y en tal caso se podrían rebajar los porcentajes analizados a: 80 % (100 %), 60 % (75 %), 40 % (50 %), 8 % (10 %) y 0,8 % (1 %).

1.1 *Experimental y resultados*

1.1.1 *Producto a ensayar* [Composición del Ejemplo 1]

Determinación de la actividad bactericida de la composición del Ejemplo 1 según la norma UNE-EN 1276

a) *Método de ensayo y su validación*

Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

b) *Condiciones experimentales*

Producto a someter a ensayo: Composición del Ejemplo 1.

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Agua dura.

Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 75 %, 50 %, 10 % y 1 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 5 minutos.

Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas bacterianas utilizadas:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Escherichia coli ATCC 10536

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 8043

c) *Resultados del ensayo*: Véase la Tabla 1.

d) *Conclusiones*: Según la norma UNE-EN 1276, la composición ensayada, cuando está diluida al 50 % en agua dura, posee actividad bactericida después de 5 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas especificadas a continuación *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae*.

(Ver Tabla 1 en la página siguiente)

TABLA 1

Resultados del ensayo del efecto bactericida de la composición del Ejemplo 1

5		Ensayo de Validación							Procedimiento de ensayo del efecto bactericida del producto: Composición del Ejemplo 1 a la concentración % (V/V)											
10	Organismo del Ensayo	Suspensión bacteriana		Control del método de dilución-Neutralización		Suspensión Bacteriana de ensayo					1 %		10 %		50 %		75 %		100 %	
15	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	V _c	111	V _c	103	10 ⁻⁶	80	111	V _c	NC	NC	NC	NC	0	0	0	0	0	0	
20			128		-		95	128	N _a	-		-		0		0		0		
20		N _v	1,2.10 ⁸	C	1,0.10 ⁸	N	1,1.10 ⁸		R	<10 ⁴		<10 ⁴		>10 ⁷		>10 ⁷		>10 ⁷		
25	<i>Escherichia coli</i>	V _c	214	V _c	220	10 ⁻⁶	162	214	V _c	NC	NC	47	41	0	0	0	0	0	0	
30			220		-		136	-	N _a	-		4,4.10 ²		0		0		0		
25		N _v	2.2.10 ⁸	C	2,2.10 ⁸	N	1,7.10 ⁸		R	<10 ⁴		3,7.10 ⁴		>10 ⁷		>10 ⁷		>10 ⁷		
30	<i>Staphylococcus aureus</i>	V _c	234	V _c	220	10 ⁻⁶	227	234	V _c	>300	>300	0	0	0	0	0	0	0	0	
35			204		219		221	204	N _a	-		0		0		0		0		
30		N _v	2,2.10 ⁸	C	2,2.10 ⁸	N	2,2.10 ⁸		R	>10 ⁵		>10 ⁷		>10 ⁷		>10 ⁷		>10 ⁷		
35	<i>Enterococcus hirae</i>	V _c	210	V _c	167	10 ⁻⁶	216	210	V _c	7	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
			199		-		216	199	N _a	8,5.10 ¹		0		0		0		0		
		N _v	2,0.10 ⁸	C	1,7.10 ⁸	N	2,1.10 ⁸		R	2,6.10 ⁵		>10 ⁷		>10 ⁷		>10 ⁷		>10 ⁷		

V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana de ensayo

N_v: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización.

NC: número de colonias en placa incontable.

1.1.2 Isopropanol

Determinación de la actividad bactericida del isopropanol según la norma UNE-EN 1276

a) Método de ensayo y su validación

Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

b) Condiciones experimentales

Producto a someter a ensayo: Isopropanol.

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Agua dura.

Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 75 %, 50 %, 10 % y 1 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 5 minutos.

ES 2 168 054 A1

Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas bacterianas utilizadas:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Escherichia coli ATCC 10536

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 8043

c) *Resultados del ensayo:* Véase la Tabla 2.

d) *Conclusiones:* Según la norma UNE-EN 1276, el isopropanol, cuando está diluido al 50 % en agua dura, posee actividad bactericida después de 5 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas especificadas a continuación *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae*.

TABLA 2

Resultados del ensayo del efecto bactericida del isopropanol

Organismo del Ensayo	Ensayo de Validación		Suspensión Bacteriana de ensayo						Procedimiento de ensayo del efecto bactericida del producto: Alcohol Isopropílico a la concentración % (V/V)									
	Suspensión bacteriana	Control del método de dilución-Neutralización																
									1 %	10 %	50 %	75 %	100 %					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	V _c	111	V _c	103	10 ⁻⁶	308	80	243	V _c	NC	NC	NC	NC	0	0	0	0	0
		128		-		355	95	-	N _a	-	-	-	-	0	0	0	0	0
	N _v	1,2.10 ⁸	C	1,0.10 ⁸	N	3,3.10 ⁸	8,8.10 ⁷	2,4.10 ⁸	R	<10 ⁴	<10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷				
<i>Escherichia coli</i>	V _c	214	V _c	220	10 ⁻⁶	267	162	188	V _c	NC	NC	NC	NC	0	0	0	0	0
		220		-		282	136	200	N _a	-	-	-	-	0	0	0	0	0
	N _v	2,2.10 ⁸	C	2,2.10 ⁸	N	2,7.10 ⁸	1,5.10 ⁸	1,9.10 ⁸	R	<10 ⁴	<10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷				
<i>Staphylococcus aureus</i>	V _c	234	V _c	220	10 ⁻⁶	361	227	250	V _c	NC	NC	NC	NC	0	0	0	0	0
		204		219		357	221	248	N _a	-	-	-	-	0	0	0	0	0
	N _v	2,2.10 ⁸	C	2,2.10 ⁸	N	3,6.10 ⁸	2,2.10 ⁸	2,5.10 ⁸	R	<10 ⁴	<10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷				
<i>Enterococcus hirae</i>	V _c	210	V _c	167	10 ⁻⁶	230	216	410	V _c	21	18	0	0	0	0	0	0	0
		199		-		250	216	400	N _a	2,0.10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0
	N _v	2,0.10 ⁸	C	1,7.10 ⁸	N	2,4.10 ⁸	2,2.10 ⁸	4,1.10 ⁸	R	0,9.10 ⁵	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷				

V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana de ensayo

N_v: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización.

NC: número de colonias en placa incontable.

ES 2 168 054 A1

1.1.3 Trietilenglicol

Determinación de la actividad bactericida del trietilenglicol según la norma UNE-EN 1276

a) *Método de ensayo y su validación*

Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

b) *Condiciones experimentales*

Producto a someter a ensayo: Trietilenglicol.

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Agua dura.

Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 75 %, 50 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 5 minutos.

Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas bacterianas utilizadas:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Escherichia coli ATCC 10536

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 8043

c) *Resultados del ensayo*: Véase la Tabla 3.

d) *Conclusiones*: Según la norma UNE-EN 1276, el trietilenglicol, cuando está diluido al 100 % en agua dura, posee actividad bactericida después de 5 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas especificadas a continuación *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

(Ver Tabla 3 en la página siguiente)

TABLA 3

Resultados del ensayo del efecto bactericida del trietilenglicol

Organismo del Ensayo	Ensayo de Validación				Suspensión Bacteriana de Ensayo				Procedimiento de ensayo del efecto bactericida del producto Trietilenglicol a la concentración % (V/V)						
	Suspensión bacteriana		Control del método de dilución-Neutralización						50 %		75 %		100 %		
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	V _c	71	V _c	67	10 ⁻⁶	71	76	V _c	NC	NC	NC	NC	0	0	
		76		70				N _a	-	-	0				
	N _v	7,4.10 ⁷	C	6,9.10 ⁷	N	7,4.10 ⁷		R	<10 ⁵	<10 ⁵	>10 ⁶				
<i>Escherichia coli</i>	V _c	186	V _c	223	10 ⁻⁶	186	189	V _c	NC	NC	NC	NC	2	2	
		189		226				N _a	-	-	2,0.10 ¹				
	N _v	1,9.10 ⁸	C	2,2.10 ⁸	N	1,9.10 ⁸		R	<10 ⁵	<10 ⁵	10 ⁶				
<i>Staphylococcus aureus</i>	V _c	113	V _c	120	10 ⁻⁶	113	117	V _c	NC	NC	NC	NC	419	-	
		117		117				N _a	-	-	4,2.10 ³				
	N _v	1,2.10 ⁸	C	1,2.10 ⁸	N	1,2.10 ⁸		R	<10 ⁵	>10 ⁵	2,9.10 ³				
<i>Enterococcus hirae</i>	V _c	114	V _c	98	10 ⁻⁶	114	111	V _c	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
		111		97				N _a	-	-	-				
	N _v	1,1.10 ⁸	C	9,8.10 ⁷	N	1,1.10 ⁸		R	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵				

V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana de ensayo

N_v: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización.

NC: número de colonias en placa incontable.

1.1.4 Sacarinato de alquildimetilbencilamonio

Determinación de la actividad bactericida del sacarinato de alquildimetilbencilamonio según la norma UNE-EN 1276

a) Método de ensayo y su validación

Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

b) Condiciones experimentales

Producto a someter a ensayo: Sacarinato de alquildimetil-bencilamonio [ONYXIDE® 3300, Millchem Ltd., R. Unido].

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Diluido al 0,37 % en isopropanol para realizar el análisis; y posterior dilución de esta solución a distintas concentraciones con agua dura.

Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 50 %, 10 % y 1 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 5 minutos.

Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas bacterianas utilizadas:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Escherichia coli ATCC 10536

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 8043

c) Resultados del ensayo: Véase la Tabla 4.

d) Conclusiones: Según la norma UNE-EN 1276, el sacarinato de alquildimetilbencilamonio diluido al 0,37 % en isopropanol, cuando está diluido al 50 % en agua dura, posee actividad bactericida después de 5 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *E. hirae*.

(Ver Tabla 4 en la página siguiente)

ES 2 168 054 A1

TABLA 4

Resultados del ensayo del efecto bactericida del sacarino de alquildimetilbencilamonio

5	Organismo del Ensayo	Ensayo de Validación							Procedimiento de ensayo del efecto bactericida del producto: ONYXIDE 3300 diluido al 0,37 % en isopropanol a la concentración % (V/V)									
10		Suspensión bacteriana		Control del método de dilución-Neutralización					Suspensión Bacteriana de Ensayo			1 %		10 %		50 %		75 %
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	V _c	145	V _c	100	10 ⁻⁶	145	-	V _c	NC	NC	>300	>300	0	0	0	0	
20			150				80	95		N _a	-	-	0	0				
		N _v	1,5.10 ⁸	C	1,0.10 ⁸	N	1,1.10 ⁸	R	<10 ⁴	<10 ⁵	>10 ⁷	>10 ⁷						
25	<i>Escherichia coli</i>	V _c	150	V _c	147	10 ⁻⁶	150	158	V _c	NC	NC	0	0	0	0	0	0	
			158				162	136		N _a	-	0	0	0	0			
		N _v	1,5.10 ⁸	C	1,5.10 ⁸	N	1,5.10 ⁸	R	<10 ⁴	<10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁷						
30	<i>Staphylococcus aureus</i>	V _c	233	V _c	202	10 ⁻⁶	233	227	V _c	NC	NC	0	0	0	0	0	0	
			216				216	221		N _a	-	0	0	0	0			
35		N _v	2,2.10 ⁸	C	2,0.10 ⁸	N	2,2.10 ⁸	R	<10 ⁴	<10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁷						
40	<i>Enterococcus hirae</i>	V _c	221	V _c	175	10 ⁻⁶	221	213	V _c	NC	NC	0	0	0	0	0	0	
			213				216	216		N _a	-	0	0	0	0			
		N _v	2,2.10 ⁸	C	1,9.10 ⁸	N	2,2.10 ⁸	R	<10 ⁴	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷						

45 V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana de ensayo

N_v: número de ufc/ml de la suspensión bacteriana

50

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

55

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización.

NC: número de colonias en placa incontable.

60

1.2 Comentarios y discusión

Después de realizar los ensayos, se deben efectuar las siguientes consideraciones:

- 5 - en primer lugar, los resultados obtenidos responden a los estudios realizados de acuerdo con la norma UNE-EN 1276 y por ello no son totalmente extrapolables a otros microorganismos y otras circunstancias. Sin embargo, se ha de tener presente que el estudio ha sido aplicado sobre cuatro cepas con características biológicas muy distintas y este hecho permite razonar que también será efectivo sobre la gran mayoría de las bacterias; y
- 10 - en segundo lugar, los resultados son comparables a los de otros antisépticos que se hayan analizado de la misma manera.

Hechas las consideraciones previas, se puede asegurar que tanto la composición del Ejemplo 1 como sus componentes, a excepción del trietilenglicol, tienen actividad bactericida, a una dilución del 50 %, ya
15 que reducen cinco logaritmos las células bacterianas con las que se ha realizado el ensayo.

Sin embargo, no todos los productos analizados tienen la misma actividad, si se ordenan de más a menos activos, se puede considerar que la composición del Ejemplo 1 es el más activo, seguido del isopropanol, el sacarinato de alquildimetilbencil-amonio y, finalmente, el trietilenglicol, que no es activo contra
20 2 de las cepas bacterianas estudiadas. La composición del Ejemplo 1 tiene más actividad bactericida que sus componentes por separado, por lo que se puede asegurar que, respecto a la actividad bactericida, es el producto ensayado más eficaz.

2. Actividad fungicida

25 Para evaluar la actividad bactericida de la composición desinfectante del Ejemplo 1 y de los compuestos que la forman, se aplicó la norma UNE-EN 1650.

Esta norma es un método de ensayo de suspensión para determinar si un antiséptico o desinfectante
30 químico tiene o no actividad fungicida en las condiciones de ensayo establecidas por la norma, tiempo de contacto 15 minutos a 20°C. Se considera que tiene actividad fungicida cuando la reducción del número de células fúngicas viables es del 99,99 %, 4 logaritmos, de las cepas dictadas por la norma: *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

35 La norma permite hacer el ensayo en condiciones limpias o sucias. En este caso, se han escogido las condiciones más extremas: condiciones sucias.

El método aplicado ha sido el de dilución -neutralización, y el producto neutralizante de la actividad fungicida ha sido 5 % de Tween 80 y 1 % de lecitina.
40

El ensayo requiere la validación de las condiciones experimentales, la validación de la no toxicidad del, neutralizador y finalmente la validación del método de dilución-neutralización. Los resultados de estas validaciones se exponen en la misma tabla que los resultados del ensayo fungicida.

45 Se debe hacer una consideración respecto a los porcentajes de la composición ensayada. En las tablas se ha descrito la concentración del producto antes de ponerlo en contacto con el interferente y las células del ensayo. En la norma no queda claro si realmente es este porcentaje el que se debe considerar o si se ha de considerar la dilución final y en tal caso se podrían rebajar los porcentajes analizados a: 80 % (100 %), 60 % (75 %), 40 % (50 %), 8 % (10 %) y 0,8 % (1 %).
50

2.1 Experimental y resultados

2.1.1 Producto a ensayar [Composición del Ejemplo 1]

55 Determinación de la actividad fungicida de la composición del Ejemplo 1 según la norma UNE-EN 1650

a) Método de ensayo y su validación

60 Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

ES 2 168 054 A1

b) Condiciones experimentales

Producto a someter a ensayo: Composición del Ejemplo

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Agua dura.

Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 50 % y 10 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 15 minutos.

Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas utilizadas:

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus niger ATCC 16404

c) Resultados del ensayo: Véase la Tabla 5.

d) Conclusiones: Según la norma UNE-EN 1650, la composición ensayada, cuando está diluida al 50 % en agua dura, posee actividad fungicida después de 15 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

TABLA 5

Resultados del ensayo del efecto fungicida de la composición del Ejemplo 1

Organismos del Ensayo	Suspensión fúngica			Ensayo de validación del método de Dilución-Neutralización		Procedimiento del ensayo del efecto Fungicida del producto: Composición del Ejemplo 1 a la concentración % (V/V)						
							10 %	50 %	100 %			
Candida albicans	V _c	524	492	V _c	64	V _c	1	0	0	0	0	0
		63	64		72	N _a	5.10 ⁰	0	0	0	0	0
	N	6,4.10 ⁷		C	6,8.10 ⁶	R	>10 ⁶	>10 ⁶	>10 ⁶			
Aspergillus niger	V _c	NC	NC	V _c	94	V _c	74	54	4	1	0	0
		20	24		103	N _a	6,4.10 ²	2,5.10 ¹	0	0	0	0
	N	2,2.10 ⁷		C	1,0.10 ⁷	R	3,4.10 ³	8,8.10 ⁴	>10 ⁶			

V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión fúngica de ensayo

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización

NC: número de colonias en placa incontable.

ES 2 168 054 A1

2.1.2 Isopropanol

Determinación de la actividad fungicida del isopropanol según la norma UNE-EN 1650

5 a) *Método de ensayo y su validación.*

Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

10 b) *Condiciones experimentales*

Producto a someter a ensayo: Isopropanol.

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Agua dura.

15 Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 50 % y 10 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 15 minutos.

20 Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

25 Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas utilizadas:

30 *Candida albicans* ATCC 10231

Aspergillus niger ATCC 16404

c) *Resultados del ensayo:* Véase la Tabla 6.

35 d) *Conclusiones:* Según la norma UNE-EN 1650, el isopropanol, cuando está diluido al 50 % en agua dura, posee actividad fungicida después de 15 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

40

45

50

(Ver Tabla 6 en la página siguiente)

55

60

TABLA 6

Resultados del ensayo del efecto fungicida del isopropanol

Organismos del Ensayo	Suspensión fúngica			Ensayo de validación del método de Dilución-Neutralización		Procedimiento del ensayo del efecto Fungicida del producto: Isopropanol a la concentración % (V/V)							
							10 %	50 %		100 %			
Candida albicans	V _c	>300	>300	V _c	240	V _c	>300	>300	0	0	0	0	
		160	124			238	N _a	-		0		0	
	N	1,4.10 ⁷		C	2,4.10 ⁶	R	<10 ⁴		>10 ⁶		>10 ⁶		
Aspergillus niger	V _c	NC	NC	V _c	100	V _c	NC	NC	0	0	0	0	
		20	24			76	N _a	-		0		0	
	N	2,2.10 ⁷		C	1,0.10 ⁷	R	<10 ³		>10 ⁶		>10 ⁶		

V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión fúngica de ensayo

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización

NC: número de colonias en placa incontable.

2.1.3 Trietilenglicol

Determinación de la actividad fungicida del trietilenglicol según la norma UNE-EN 1650

a) Método de ensayo y su validación

Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

b) Condiciones experimentales

Producto a someter a ensayo: Trietilenglicol.

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Agua dura.

Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 50 % y 10 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 15 minutos.

Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas utilizadas:

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus niger ATCC 16404

c) *Resultados del ensayo*: Véase la Tabla 7.

d) *Conclusiones*: Según la norma UNE-EN 1650, el trietilenglicol cuando está diluido al 100 % en agua dura, posee actividad fungicida después de 15 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

TABLA 7

Resultados del ensayo del efecto fungicida del trietilenglicol

Organismos del Ensayo	Suspensión fúngica			Ensayo de validación del método de Dilución-Neutralización		Procedimiento del ensayo del efecto Fungicida del producto: Trietilenglicol a la concentración % (V/V)						
							10 %	50 %	100 %			
Candida albicans	10 ⁻⁴	>300	>300	V _c	46	V _c	NC	NC	NC	NC	0	0
	10 ⁻⁵	160	124		28	N _a	-	-	-	-	0	
	N	1,4.10 ⁷		C	3,7.10 ⁶	R	<10 ⁴		<10 ⁴		>10 ⁶	
Aspergillus niger	10 ⁻⁵	NC	NC	V _c	162	V _c	NC	NC	NC	NC	0	0
	10 ⁻⁶	20	24		179	N _a	-	-	-	-	0	
	N	2,2.10 ⁷		C	1,7.10 ⁷	R	<10 ³		<10 ³		>10 ⁶	

V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión fúngica de ensayo

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización

NC: número de colonias en placa incontable.

2.1.4 Sacarinato de alquildimetilbencilamonio

Determinación de la actividad fungicida del sacarinato de alquildimetilbencilamonio según la norma UNE-EN 1650

a) *Método de ensayo y su validación*

Método: Dilución-neutralización.

Neutralizador: 5 % Tween 80 + 1 % lecitina.

b) *Condiciones experimentales*

Producto a someter a ensayo: Sacarinato de alquildimetil-bencilamonio [ONYXIDE® 3300, Millchem Ltd., R. Unido].

Diluyente del producto analizado durante el ensayo: Diluido al 0,37 % en isopropanol y posterior dilución de esta solución a distintas concentraciones con agua dura.

ES 2 168 054 A1

Concentración del producto a someter a ensayo: 100 %, 50 % y 10 %.

Aspecto de las diluciones del producto: Claro y transparente.

Tiempos de contacto: 15 minutos.

Temperatura del ensayo: 20°C.

Sustancia interferente: Albúmina 3 g/l.

Estabilidad de la mezcla: Ausencia de precipitados durante el ensayo.

Temperatura de incubación: 20°C.

Identificación de las cepas utilizadas:

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus niger ATCC 16404

c) *Resultados del ensayo*: Véase la Tabla 8.

d) *Conclusiones*: Según la norma UNE-EN 1650, el sacarinato de alquildimetilbencilamonio al 0,37 % en isopropanol, cuando está diluido al 50 % en agua dura, posee actividad fungicida después de 15 minutos a 20°C en condiciones sucias (solución acuosa de albúmina bovina 3 % g/l) para las cepas *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

TABLA 8

Resultados del ensayo del efecto fungicida del sacarinato de alquildimetilbencilamonio

Organismos del Ensayo	Suspensión fúngica			Ensayo de validación del método de Dilución-Neutralización		Procedimiento del ensayo del efecto Fungicida del producto: Isopropanol a la concentración % (V/V)						
							10 %		50 %		100 %	
Candida Albicans	V _c	>300	>300	V _c	40	V _c	1	0	0	0	0	0
		412	429		30	N _a	5.10 ⁰		0		0	
	N	4,2.10 ⁷		C	3,7.10 ⁶	R	10 ⁶		>10 ⁶		>10 ⁶	
Aspergillus niger	V _c	NC	NC	V _c	164	V _c	350	400	0	0	0	0
		20	24		164	N _a	3,8.10 ³		0		0	
	N	2,2.10 ⁷		C	1,6.10 ⁷	R	<10 ³		>10 ⁶		>10 ⁶	

V_c: recuento viable

N: número de ufc/ml de la suspensión fúngica de ensayo

R: reducción de la viabilidad

N_a: número de ufc/ml en la mezcla de ensayo

C: número de ufc/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización

NC: número de colonias en placa incontable.

2.2 Comentarios y discusión

Después de realizar los ensayos fungicidas de acuerdo con la norma UNE-EN 1650, se deben efectuar las mismas consideraciones que con los ensayos de actividad bactericida:

- en primer lugar, los resultados obtenidos responden a los estudios realizados de acuerdo con la norma UNE-EN 1276 y por ello no son totalmente extrapolables a otros hongos y otras circunstancias. Sin embargo, se ha de tener presente que el estudio ha sido aplicado sobre dos cepas de hongos muy distintas y este hecho permite razonar que también será efectivo para otras cepas fúngicas; y
- en segundo lugar, los resultados son comparables a los de otros antisépticos que se hayan analizado de la misma manera.

Hechas las consideraciones previas, se puede asegurar que tanto la composición del Ejemplo 1 como sus componentes, tienen actividad fungicida.

Ejemplo 3

Estudios preliminares sobre el uso de la detección de ATP

El ATP (adenosín trifosfato) es una molécula universalmente distribuida en las células de los seres vivos. Su función es esencial en las células porque capta y transporta el poder reductor que se obtiene de los nutrientes, por lo que su papel de moneda energética es fundamental para el metabolismo celular.

La detección de ATP sobre una superficie es indicativa de que hay restos celulares que pueden ser: vegetales, animales, hongos o bacterias. Los virus no tienen ATP ya que no son organismos celulares, no tienen metabolismo propio y para multiplicarse requieren una célula a la que infectar.

La presencia de ATP se detecta por una reacción lumínica. La presencia de ATP sobre una superficie permite inferir que contiene restos celulares. Sin embargo, no permite saber de qué tipo se trata, es decir, la detección de ATP es inespecífica. La prueba de ATP es un test de higiene, no un test microbiológico.

Para comprobar la posible utilidad de esta prueba para detectar la eficacia de la composición del Ejemplo 1, se diseñó un experimento consistente en detectar la presencia de ATP, con ayuda de un luminómetro sobre una superficie antes y después de rociarla con la composición del Ejemplo 1. Para que la superficie estuviera sucia, el día anterior de la prueba se extendió una suspensión de microorganismos sobre la superficie, y se realizaron los 3 experimentos siguientes:

[1] Se detectó la concentración de ATP en la zona más sucia de la superficie, según las instrucciones del luminómetro [HY-Lite 2 (Merck)]. En este caso, el aparato indicó que la concentración de ATP era más alta de lo que podía analizar, el aparato estaba saturado. Sobre otra zona de la misma superficie se aplicó la composición del Ejemplo 1 durante 4 segundos a una distancia de 20 cm y se deja actuar durante 20 minutos. Pasado este tiempo se vuelve a medir la presencia de ATP y el luminómetro seguía estando fuera de intervalo.

[2] Se repitió el experimento [1] pero esta vez se analizó la presencia de ATP de una zona de la superficie más limpia. Esta vez se detectó con el luminómetro [HY-Lite 2 (Merck)] un valor de 8.100. Sobre una zona cercana se roció la composición del Ejemplo 1 en las mismas condiciones que el experimento [1]. A los 20 minutos la detección de ATP era de 740.

[3] Se realizó un tercer experimento cambiando las condiciones. La detección de ATP fue de 13.100. Esta vez se aplicó la composición del Ejemplo 1 durante 20 segundos a 40 cm y se dejó actuar durante 20 minutos. Transcurrido ese periodo de tiempo, se volvió a cuantificar la señal luminosa y se obtuvo un valor de 5.400.

Aunque estos experimentos son muy preliminares, son, sin embargo, muy prometedores. Las condiciones experimentales se deben optimizar: tiempo de actuación del producto, distancia, tiempo de rociado, tipo de superficie, etc. No obstante, se puede concluir que la composición del Ejemplo 1 es capaz de reducir la concentración de ATP sobre la superficie estudiada y que ese efecto se ha podido medir con un luminómetro.

Paralelamente con el análisis de ATP se hicieron unas sencillas pruebas microbiológicas. Se detectó la presencia de microorganismos antes y después de aplicar la composición del Ejemplo 1 en la superficie del experimento [2]. Con placas de agar Rosa de Bengala para cuantificar hongos de superficies y con placas de TSA para cuantificar bacterias heterótrofas totales. En ambos casos, las placas se incubaron 3 días a 30°C.

En las placas de Rosa de Bengala se pudieron cuantificar 47 colonias de hongos antes de aplicar la composición del Ejemplo 1 y 25 después de aplicarlo. En las placas de TSA, aunque no se pudo hacer un análisis cuantitativo si se hizo un análisis cualitativo y se pudo apreciar una reducción del número de colonias crecidas después de usar la composición del Ejemplo 1. Estos resultados indicaban que en el experimento [2], la reducción de ATP medida con el luminómetro era posiblemente debida a una reducción del número de bacterias y de hongos en la superficie estudiada.

REIVINDICACIONES

1. Una composición desinfectante que comprende (i) un alcohol seleccionado del grupo formado por etanol, isopropanol y sus mezclas, en una cantidad comprendida entre el 92 % y el 99,6 % en peso respecto al total de la composición, (ii) sacarinato de alquildimetilbencilamonio, en una cantidad comprendida entre 0,3 % y 0,4 % en peso respecto al total de la composición, y, opcionalmente, (iii) trietilenglicol, en una cantidad comprendida entre 0 % y 7,6 % en peso respecto al total de la composición.

2. Composición según la reivindicación 1, en el que dicho componente (i) es isopropanol.

3. Composición según la reivindicación 1, en el que dicho componente (i) es una mezcla binaria de etanol e isopropanol, en cualquier proporción.

4. Composición según la reivindicación 3, en el que dicha mezcla de etanol e isopropanol tiene una relación ponderal 65:35 (etanol:isopropanol).

5. Composición según la reivindicación 1, que comprende, además, uno o más excipientes.

6. Composición según la reivindicación 5, en el que dichos excipientes se seleccionan entre estabilizantes, conservantes, aromas y colorantes.

7. Composición según la reivindicación 1, que presenta la siguiente formulación:

Isopropanol	99,6 %
Sacarinato de alquildimetilbencilamonio	0,4 %

donde todos los porcentajes son en peso respecto al total de la composición.

8. Composición según la reivindicación 1, que presenta la siguiente formulación

Isopropanol	92,25 %
Sacarinato de alquildimetilbencilamonio	0,37 %
Trietilenglicol	7,38 %

donde todos los porcentajes son en peso respecto al total de la composición.

9. Un método para desinfectar una superficie que comprende aplicar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en una cantidad desinfectante, sobre la superficie a desinfectar.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 168 054
⑫ N.º solicitud: 200000358
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 16.02.2000
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: A61L 2/18, A01N 33/12, 31/02, C11D 1/62

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AU 650014 A (KEITH WHITELEY, R) 09.06.1994, reivindicaciones.	1-9
A	ES 2050627 A (LAB. INIBSA S.A.) 16.05.1994, todo el documento.	1-9
A	ES 2086393 T (CIBA-GEIGY, AG) 01.07.1996, reivindicaciones.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
15.04.2002

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/1