



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0913389-5 B1

(22) Data do Depósito: 20/05/2009

(45) Data de Concessão: 04/07/2017



(54) Título: FORMULAÇÕES CONSERVANTES E MÉTODO DE REDUÇÃO DA CARGA BACTERIANA E FÚNGICA DE UMA PREPARAÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 8/49; A61K 8/34; A61Q 19/00

(52) CPC: A61K 8/49,A61K 8/34,A61Q 19/00,A61K 2800/524

(30) Prioridade Unionista: 03/06/2008 US 61/058,362, 15/08/2008 EP 08014560.0

(73) Titular(es): LONZA INC.. LONZA LTD

(72) Inventor(es): ROSITA NUNEZ; JOSEPH KIMLER; LARRY KENT HALL; CRYSTAL NESBITT; CRAIG CARTER

**"FORMULAÇÕES CONSERVANTES E MÉTODO DE REDUÇÃO DA CARGA
BACTERIANA E FÚNGICA DE UMA PREPARAÇÃO"**

[001] A presente invenção divulga formulações conservantes sinérgicas compreendendo compostos bactericidas e fungicidas, um método de redução da carga bacteriana e fúngica de um preparo assim como o uso das formulações conservantes sinérgicas de acordo com a invenção para a redução da carga bacteriana e fúngica de preparações.

[002] Uma ampla variedade de produtos, formulações e preparações de uso pessoal, doméstico e industrial necessitam de proteção contra contaminação com bactérias e fungos. Isto é geralmente conseguido pela adição de liberadores de formaldeído e/ou parabenos por causa das boas propriedades bactericidas e fungicidas desses compostos.

[003] Entretanto, esses compostos da técnica sofrem de algumas desvantagens severas, ou seja, que sua capacidade de conservação é tão alta que seu efeito continua mesmo após, por exemplo, no caso de uma loção, ser aplicada sobre a pele, absorvida, distribuída através do sangue e depositada nos principais órgãos do corpo. Como o formaldeído e os parabenos prejudicam a função enzimática, existe a possibilidade de interferência com a célula humana normal e função celular.

[004] Portanto, o problema técnico a ser solucionado pela presente invenção é fornecer formulações conservantes que evitem as desvantagens daqueles de acordo com a técnica. Esse problema é solucionado pela redução da concentração necessária da formulação enquanto ainda mantém

controle microbiano através da surpreendente e inesperada cooperação sinérgica de pelo menos dois compostos.

[005] É, portanto, um objeto da presente invenção fornecer uma formulação conservante compreendendo a combinação de pelo menos dois compostos com propriedades bactericidas e/ou fungicidas, onde a respectiva combinação é selecionada a partir do grupo que consiste em metilisotiazolinona/piroctona olamina; caprilil glicol/ácido deidroacético; undecanol/ácido deidroacético e álcool laurílico/ácido sórbico.

[006] O composto bactericida preferivelmente está presente em uma concentração de 1% a 5%, quando o composto bactericida é uma metilisotiazolinona, e 25% a 75% quando é caprilil glicol, undecanol e álcool laurílico. Ainda mais preferido, o composto bactericida está presente em uma concentração de 1,5% a 3% quando é uma metilisotiazolinona, e 30% a 70% quando é caprilil glicol, undecanol e álcool laurílico.

[007] O composto fungicida preferivelmente está presente em uma concentração de 25% a 99%. Ainda mais preferivelmente, o composto fungicida de acordo com a invenção está presente em uma concentração de 30% a 95%.

[008] Todos os percentuais são percentuais em peso a menos que afirmado de outro modo.

[009] O isômero de metilisotiazolinona preferido é 2-metilisotiazolinon-3-ona. Entretanto, outros isômeros estão também dentro do escopo da invenção.

[0010] Pode ser preferido que as formulações conservantes de acordo com a invenção são combinadas com solventes apropriados. Preferivelmente, os solventes

referidos são selecionados da classe de glicóis. Mais preferivelmente, os referidos solventes são selecionados a partir do grupo que consiste em propileno glicol, butileno glicol e pentileno glicol.

[0011] O método de redução da carga bacteriana e fúngica de um preparo de acordo com a presente invenção preferivelmente compreende a adição de uma formulação conservante compreendendo pelo menos dois compostos com propriedades bactericidas e/ou fungicidas à preparação a ser conservada. Os compostos bactericidas e fungicidas preferidos, suas concentrações e combinações preferidas são como afirmado acima.

[0012] Geralmente, as preparações de acordo com a invenção podem ser adicionadas a uma ampla variedade de produtos, formulações e preparações de uso pessoal, doméstico e industrial.

[0013] Preparações preferidas de acordo com a invenção são selecionadas a partir do grupo que consiste em preparações cosméticas tal como loções, cremes, emplastros e unguentos, limpadores, detergentes, produtos para a higiene feminina, lenços de limpeza, preparações para uso veterinário, preparações capilares tais como xampus, condicionadores, géis, fixadores e sprays.

[0014] Outro objeto da presente invenção é o uso das formulações conservantes sinérgicas de acordo com a invenção para a redução da carga bacteriana e fúngica de preparações. Todos os detalhes relacionados aos compostos bactericidas e fungicidas preferidos, suas concentrações e combinações preferidas assim como as preparações preferidas onde as formulações conservantes sinérgicas podem ser

aplicadas são as mesmas que aquelas dadas acima.

[0015] A invenção será agora descrita por meio dos seguintes, exemplos não limitantes.

Exemplo 1

[0016] Teste de desafio do conservante foi realizado para avaliar o desempenho das misturas em preparações cosméticas terminadas. O teste foi conduzido em uma base de xampu e loção como descrito neste. Uma cultura mistura bacteriana padronizada foi preparada como em seguida. Três Ágar Tryptic Soy individuais inclinados de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foram incubados a aproximadamente 35°C por ~24 horas. Cada meio inclinado foi então lavado com 5 mL de Água de Diluição com Tampão Fosfato estéril (PBDW). O volume de 5 mL foi transferido a mais 5 ml de BPDW até um total de 10 mL de suspensão individual bacteriana. A absorbância de cada suspensão individual foi medida espectrofotometricamente a 530nm após calibragem do instrumento com PBDW sozinha. Cada suspensão individual foi padronizada a $\sim 10^9$ CFU/mL. Cinco mL foram assepticamente transferidos de cada suspensão individual a um copo medida de espécime estéril para criar a "Mistura Bacteriana". Então 40g de cada amostra de xampu e loção foram inoculados com 0,2 mL da solução bacteriana padronizada e cada amostra foi bem mistura fúngica.

[0017] Duas inclinações individuais de Ágar Sabouraud de *Candida albicans* (ATCC 10231), e três placas de Ágar Sabouraud de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) foram incubadas a aproximadamente 30°C por ~24 horas e 5 dias, respectivamente. O meio inclinado com *Candida* foi então

lavado com 5 mL de Água de Diluição com Tampão Fosfato estéril (PBDW). Os 5 mL foram transferidos a 5 mL adicionais de BPDW para um total de 10 mL de suspensão individual de *Candida*. Para o *Aspergillus*, um swab de algodão estéril foi imerso em um tubo com 10 mL de PBDW estéril e então mergulhado em um estéril tubo de Tween 80. O swab foi então movimentado para trás e para frente através de cada uma das placas de *Aspergillus*, transferindo os esporos ao tubo com 10 mL de PBDW entre cada processo de remoção de esporo. Um mL de cada uma das suspensões foi transferido a um tubo separado de 9 mL de PBDW. Cada uma dessas suspensões 1:9 foi medida em um hemacitômetro e as suspensões originais foram padronizadas a $\sim 10^7$ células/mL. Sete mL foram assepticamente transferidos de cada suspensão individual a um copo medida estéril de espécime para criar o "Fungo Misturado". Então 40g de cada amostra de xampu e de loção foram inoculados com 0,4 mL da solução fúngica padronizada e cada amostra foi bem mistura fúngica.

[0018] Nos dias 0, 7, 14 e 28, amostras foram preparadas como em seguida. Um grama de cada amostra foi assepticamente transferido a um tubo com caldo neutralizante separado 9 mL D/E para formar a diluição 10^{-1} . Diluições em série foram preparadas através de uma diluição a 10^{-6} em BPDW. As diluições em série para as culturas bacterianas foram plaqueadas vertendo-se a placa com Ágar Tryptic Soy e incubando a $\sim 35^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Diluições em série para as amostras fúngicas foram plaqueadas vertendo-se a placa com Ágar Sabouraud e incubando a $\sim 30^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. As placas foram enumeradas após o período de incubação. Os resultados são demonstrados

na Tabelas 1 e 2. As misturas foram eficazes na redução significativa das contagens bacteriana e fúngica durante um período de 28 dias.

Tabela 1

Dados do Desafio com o Conservante
Contagens de Mistura Bacteriana (CFU/grama)

Amostras de teste	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 28
Loção sem conservante	$1,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$
Loção + 95 ppm metilisotiazolinona + 0,5% piroctona olamina	$1,7 \times 10^7$	<10	<10	<10
Loção + 1% caprilil glicol + 0,5% ácido deidroacético	$1,1 \times 10^7$	<10	<10	<10
Loção + 0,5% undecanol + 0,5 ácido deidroacético	$1,3 \times 10^7$	<10	<10	<10
Xampu sem conservante	$9,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$
Xampu + 0,5% álcool laurílico + 0,5% ácido sórbico	$1,2 \times 10^7$	<10	<10	<10

Inóculo:

Mistura Bacteriana - quantidades aproximadamente iguais de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*.

9×10^5 a $5,5 \times 10^6$

Tabela 2

Dados de Desafio com Conservante
Contagens de Mistura fúngica (CFU/grama)

Amostras de teste	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 28
Loção sem conservante	$5,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$

Loção + 95 ppm metilisotiazolinona + 0,5% piroctona olamina	$1,0 \times 10^5$	<10	<10	<10
Loção + 1% caprilil glicol + 0,5% ácido deidroacético	$2,0 \times 10^5$	<10	<10	<10
Loção + 0,5% undecanol + 0,5 ácido deidroacético	$1,2 \times 10^5$	<10	<10	<10
Xampu sem conservante	$9,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$
Xampu + 0,5% álcool laurílico + 0,5% ácido sórbico	$3,0 \times 10^5$	<10	<10	<10

Inóculo:

Fungo Misturado - quantidade aproximadamente igual de *C. albicans* e *A. niger*. $6,9 \times 10^4$ to $1,2 \times 10^5$

Exemplo 2

[0019] Concentrações inibitórias mínimas (MIC) foram determinadas para componentes individuais e formulações binárias como em seguida. Suspensões bacterianas individuais de *S. aureus* (gram positiva), *E. coli* e *P. aeruginosa* (ambas gram negativas) e suspensões fúngicas individuais de *C. albicans* e *A. niger* foram preparadas como descrito no Exemplo 1. Cada suspensão individual foi padronizada com PBDW para render $\sim 10^8$ CFU/mL ou $\sim 10^7$ células/mL para a bactéria e fungo individual, respectivamente.

[0020] Os componentes individuais e formulações binárias foram diluídos em tanto água DI ou propileno glicol (como apropriado para solubilidade) para render uma solução ativa de partida a um total de 10.000 ppm. Da solução a 10.000 ppm, um diluição 1:9 foi feita em Caldo

Nutritivo estéril para render uma solução ativa a 1.000 ppm. Cinco mL da diluição a 1.000 ppm foram transferidos a cinco mL de estéril Caldo Nutritivo (NB) para render uma solução ativa a 500 ppm. Esse esquema de diluição foi repetido até que a solução ativa ficou em 3,90 ppm. As mesmas diluições foram feitas em estéril Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) para o teste MIC fúngico. A série de nove soluções ativas (3,9 ppm - 1000 ppm) foi preparada para cada um dos cinco microorganismos a serem testados.

[0021] Da suspensão de *E. coli*, 0,1 mL foi adicionado a cada uma das nove soluções ativas com 5 mL em NB. Cada tubo foi misturado vigorosamente. Isso foi repetido para cada uma das suspensões bacterianas. De modo similar, 0,1 mL da suspensão de *C. albicans* foi adicionado a cada uma das nove soluções ativas com 5 mL em SDB. Isso foi repetido com *A. niger* em um conjunto separado de diluições. Cada tubo foi misturado vigorosamente. Os controles foram preparados para cada organismo pela inoculação de 5 mL de NB ou SDB, como apropriado. Todos os três conjuntos de tubos bacterianos foram incubados a 35°C por 48 horas e os dois conjuntos de tubos fúngicos foram incubados a 30°C por 72 e 120 horas. Com o término do período de incubação, os tubos foram misturados e visualmente inspecionados para turbidez em uma comparação com o controle. A menor concentração com uma ausência de turbidez foi gravada como a Concentração Inibitória Mínima (MIC). Os resultados são demonstrados nas Tabelas 3 e 4.

[0022] O valor de sinergismo é $(Q_A/Q_a + Q_B/Q_b)$. Q_A é a concentração de componente A na mistura, Q_a é a concentração de componente A unicamente aplicado, Q_B é a

concentração de componente B na mistura, Q_b é a concentração de componente B unicamente aplicado. Quando o valor de sinergismo é menos do que um, a mistura é sinérgica. Valores para $(Q_A/Q_a + Q_B/Q_b)$ de 1 e maior do que 1 representam um efeito aditivo e um efeito antagonista, respectivamente.

Tabela 3

Valores de MIC (em ppm) para formulações conservantes versus bactérias

Tipo de organismo	Gram (+)	Gram (-)	Gram (-)
Nome do organismo	S. aureus	P. aeruginosa	E. coli
Numero da cepa ATCC	6538	9027	8739
Mistura de Caprilil glicol e ácido deidroacético	500	500	500
Q_A	250	250	250
Q_a	>1000	>1000	1000
Q_B	250	250	250
Q_b	500	500	500
$Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$	<0,75	<0,75	0,75
Mistura de undecanol e ácido	1000	500	1000

deidroacético			
Q _A	500	250	500
Q _a	>1000	>1000	>1000
Q _B	500	250	500
Q _b	500	500	500
Q _A /Q _a + Q _B /Q _b	<1,5	<0,75	<1,5

Tabela 4

Valores de MIC (em ppm) para formulações conservantes versus formulações de bactérias, leveduras e fungos com piroctona olamina

Tipo de organismo	Gram (+)	Gram (-)	Gram (-)	Bolor	Levedura
Nome do organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
Numero da cepa ATCC	6538	9027	8739	16404	10231
Mistura de metilisoti azolinona e Piroctona Olamina	31,25	31,25	31,25	7,81	7,81
Q _A	15,63	15,63	15,63	3,91	3,91
Q _a	250	62,5	62,5	500	250
Q _B	15,63	15,63	15,63	3,91	3,91
Q _b	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
Q _A /Q _a + Q _B /Q _b	0,31	0,5	0,5	0,07	0,08

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação conservante **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a combinação de dois compostos tendo propriedades bactericidas e fungicidas, em que a respectiva combinação é álcool laurílico/ácido sórbico.

2. Formulação conservante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o álcool laurílico está presente em uma concentração de 25% a 75%.

3. Formulação conservante **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a combinação de dois compostos tendo propriedades bactericidas e fungicidas, em que a respectiva combinação é metilisotiazolinona / piroctona olamina e em que a metilisotiazolinona está presente em uma concentração de 1% a 5%.

4. Formulação conservante, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o composto bactericida está presente em uma concentração de 1,5% a 3% quando é metilisotiazolinona, e 30% a 70% quando é álcool laurílico.

5. Método de redução da carga bacteriana e fúngica de uma preparação **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a adição da formulação conservante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 à preparação.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a preparação é selecionada a partir do grupo que consiste em produtos, formulações e preparações de uso pessoal, doméstico e industrial.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a preparação é selecionada a partir do grupo que consiste em preparações cosméticas tal

como loções, cremes, emplastos e unguentos, limpadores, detergentes, preparações para a higiene feminina, lenços de limpeza, preparações de uso veterinário, e preparações capilares tais como xampus, condicionadores, géis, fixadores e sprays.