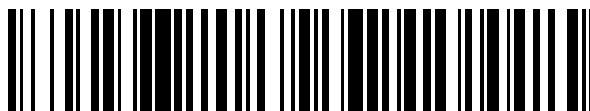


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 543**

51 Int. Cl.:

**A01N 35/02** (2006.01)  
**A01P 1/00** (2006.01)  
**A01P 3/00** (2006.01)  
**A01N 31/04** (2006.01)  
**A01N 31/08** (2006.01)  
**A01N 39/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2018** **PCT/EP2018/067310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2019** **WO19002400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2018** **E 18732811 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021** **EP 3644738**

54 Título: **Mezcla antimicrobiana que contiene 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y un alcohol aromático, y composición cosmética que la contiene**

30 Prioridad:

**30.06.2017 FR 1756156**  
**30.06.2017 FR 1756166**  
**18.08.2017 FR 1757741**  
**18.08.2017 FR 1757743**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.11.2021**

73 Titular/es:

**L'OREAL (100.0%)**  
**14 rue Royale**  
**75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MENARD-SZCZEBARA, FLORENCE;**  
**CUPFERMAN, SYLVIE y**  
**GALVAN, JULIEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 875 543 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

Mezcla antimicrobiana que contiene 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y un alcohol aromático, y composición cosmética que la contiene

El objeto de la presente invención es una mezcla antibacteriana que contiene 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y un alcohol aromático, y también una composición cosmética que contiene una mezcla de este tipo.

La 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona (compuesto cetónico) es una sustancia útil como agente conservante para composiciones cosméticas, para proteger las composiciones contra la contaminación microbiana, tal como se describe en la solicitud de patente WO 2011/039445.

Sin embargo, es deseable poder incorporar dicho compuesto cetónico en concentración reducida en composiciones, especialmente composiciones cosméticas o dermatológicas, mientras que al mismo tiempo mantener un buen comportamiento de conservación antimicrobiana. Por lo tanto, para este fin se buscan combinaciones del compuesto cetónico con otros compuestos que tengan eficacia antimicrobiana.

Los autores de la invención han descubierto, inesperadamente, que la combinación de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona con un alcohol aromático elegido de un fenoxialcohol, tal como 2-fenoxialcohol, alcohol feniletílico y alcohol bencílico, posibilita obtener una mezcla antimicrobiana que tenga actividad antimicrobiana sinérgica.

Los resultados de los ejemplos descritos más adelante demuestran la actividad antimicrobiana sinérgica obtenida con mediciones de la concentración mínima inhibitoria (MIC) tomadas con varias mezclas. La actividad antimicrobiana se considera sinérgica cuando la mezcla antimicrobiana posibilita obtener un porcentaje de crecimiento de la cepa menor que o igual a 20%, o incluso menor que o igual a 25%.

La combinación de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona con un fenoxialcohol, tal como 2-fenoxietanol, posibilita obtener una mezcla antimicrobiana que tiene actividad antimicrobiana sinérgica, en particular en mohos, en particular en *Aspergillus niger*, en bacterias gram-positivas, en particular en *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, en bacterias gram-negativas, en particular en *Pseudomonas aeruginosa*, y en levaduras, en particular en *Candida albicans*.

La solicitud FR-A-2962333 describe una composición cosmética para el tratamiento de la piel grasa, que comprende un fenol de 2-alcoxi-4-alkilcetona y un aceite esencial. La composición puede comprender un agente activo adicional para el cuidado de la piel grasa tal como agentes antimicrobianos, entre los que se hace mención a fenoxietanol. Este documento no describe específicamente una mezcla antimicrobiana constituida por la combinación de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona con fenoxietanol, y tampoco sugiere que una mezcla de este tipo tenga una actividad antimicrobiana sinérgica en mohos, en particular en *Aspergillus niger*, en bacterias gram-positivas, en particular en *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, en bacterias gram-negativas, en particular en *Pseudomonas aeruginosa*, y en levaduras, en particular en *Candida albicans*.

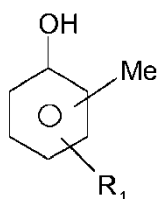
La combinación de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona con el alcohol feniletílico posibilita obtener una mezcla antimicrobiana con actividad antimicrobiana sinérgica, en particular en levaduras, en particular sobre *Candida albicans*.

La combinación de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona con alcohol bencílico, posibilita obtener una mezcla antimicrobiana que tiene actividad antimicrobiana sinérgica, en particular en mohos, en particular en *Aspergillus niger* y en bacterias gram-positivas, en particular en *Enterococcus faecalis*.

La combinación de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona con un compuesto de cresol, en particular 4-isopropil-3-metilfenol, posibilita obtener una mezcla antimicrobiana que tiene actividad antimicrobiana sinérgica, en particular sobre gram-positivos, en particular, sobre *Enterococcus faecalis*, y sobre levaduras, en particular sobre *Candida albicans*.

Un objeto de la invención es una mezcla antimicrobiana que comprende, o está constituida por, 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y un alcohol aromático elegido de:

- i) un fenoxialcohol de fórmula  $C_6H_5-O-R-OH$ , designando R un radical hidrocarbonado divalente que tiene 2 o 3 átomos de carbono;
- ii) alcohol feniletílico;
- ii) alcohol bencílico;
- iv) un compuesto de cresol de fórmula (I):



(I)

en que  $R_1$  designa H o un radical isopropilo.

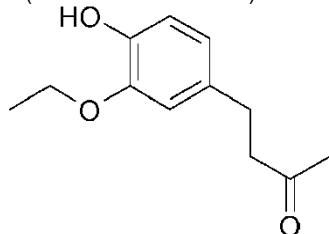
También un objeto de la invención es una composición, especialmente una composición cosmética o dermatológica, que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, dicha mezcla descrita previamente.

Un objeto adicional de la invención es un procedimiento para el tratamiento cosmético no terapéutico de materiales queratínicos, que comprende la aplicación a los materiales queratínicos de una composición como se ha descrito previamente. El procedimiento puede ser un procedimiento cosmético para cuidar, maquillar o limpiar materiales queratínicos.

Es también objeto de la invención un procedimiento de conservación de una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable, en particular una composición cosmética o dermatológica, caracterizado porque consiste en incorporar a dicha composición una mezcla antimicrobiana tal como se describió previamente.

Un objeto de la invención es también el uso de la mezcla antimicrobiana descrita previamente para conservar una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable.

4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona es un compuesto de fórmula:



De acuerdo con una primera realización, un objeto de la invención es una mezcla antimicrobiana que comprende, o está constituida por, 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y un fenoxialcohol de fórmula  $C_6H_5-O-R-OH$ , designando R un radical hidrocarbonado divalente que tiene 2 o 3 átomos de carbono.

El fenoxialcohol descrito previamente se puede elegir de 2-fenoxietanol o 1-fenoxi-2-propanol. Se utiliza preferiblemente 2-fenoxietanol.

2-fenoxietanol corresponde al compuesto de fórmula  $C_6H_5-O-CH_2-CH_2-OH$  (Nº CAS: 122-99-6).

Ventajosamente, 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y el fenoxialcohol previamente descrito están presentes en dicha mezcla en un contenido tal que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol varía de 0,15 a 3,5, preferiblemente varía de 0,15 a 3,2, y más preferiblemente varía de 0,2 a 3,2.

La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,6 a 1,6, preferiblemente que varía de 0,7 a 1,4, preferiblemente que varía de 0,8 a 1,2 y más preferiblemente que varía de 0,9 a 1,1. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre mohos, especialmente sobre *Aspergillus niger*.

La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,4 a 0,8, preferiblemente que varía de 0,45 a 0,7, y más preferiblemente que varía de 0,45 a 0,6. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre la bacteria gram-positiva *Enterococcus faecalis*.

La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,3 a 3,2, preferiblemente que varía de 0,3 a 2,4, preferiblemente que varía de 0,3 a 1,4 y más preferiblemente que varía de 0,3 a 1,2. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre la bacteria gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

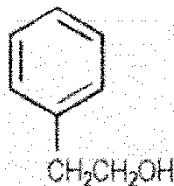
La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,2 a 3,2, preferiblemente de 0,4 a 3,2, preferiblemente que varía de 0,8 a 3,2, preferiblemente que varía de 1,6 a 3,2, preferiblemente que varía de 0,2 a 2,4, preferiblemente que varía de 0,4 a 2,4, preferiblemente que varía de

0,8 a 2,4 y más preferiblemente que varía de 1,6 a 2,4. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre bacterias gram-positivas, especialmente sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,15 a 1,3, preferiblemente que varía de 0,15 a 0,7 y preferiblemente que varía de 0,25 a 0,5. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre levaduras, en particular sobre *Candida albicans*.

De acuerdo con una segunda realización, un objeto de la invención es una mezcla antimicrobiana que comprende, o está constituida por, 4-(3-etoxi-4- hidroxifenil)butan-2-ona y alcohol feniletílico.

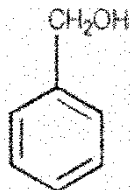
El alcohol feniletílico corresponde al compuesto alcohol 2-feniletílico (Nº CAS: 60-12-8) de fórmula:



Ventajosamente, 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y el alcohol feniletílico están presentes en dicha mezcla en un contenido tal que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/alcohol feniletílico varía de 0,05 a 1, preferiblemente varía de 0,09 a 0,9, y más preferiblemente varía de 0,3 a 0,85.

De acuerdo con una tercera realización, un objeto de la invención es una mezcla antimicrobiana que comprende, o está constituida por, 4-(3-etoxi-4- hidroxifenil)butan-2-ona y alcohol bencílico.

Alcohol bencílico (Nº CAS: 100-51-6) corresponde al compuesto de fórmula:



Ventajosamente, 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y el alcohol bencílico están presentes en dicha mezcla en un contenido tal que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/alcohol feniletílico varía de 0,1 a 1,5 y preferiblemente varía de 0,1 a 1,2.

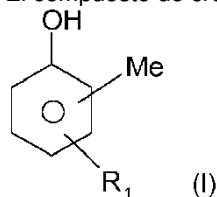
La mezcla antimicrobiana de acuerdo con la invención tiene actividad antimicrobiana sinérgica, en particular sobre mohos, especialmente sobre *Aspergillus niger*, y sobre bacterias gram-positivas, en particular sobre *Enterococcus faecalis*.

La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/alcohol bencílico que varía de 0,15 a 0,8, preferiblemente que varía de 0,2 a 0,6. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre mohos, especialmente sobre *Aspergillus niger*.

La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/alcohol bencílico que varía de 0,1 a 1,5, preferiblemente que varía de 0,1 a 1,2. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre la bacteria gram-positiva *Enterococcus faecalis*.

De acuerdo con una cuarta realización, un objeto de la invención es una mezcla antimicrobiana que comprende, o está constituida por, 4-(3-etoxi-4- hidroxifenil)butan-2-ona y un compuesto cresol definido a continuación.

El compuesto de cresol utilizado de acuerdo con la invención es un compuesto de fórmula (I):



en que R<sub>1</sub> designa H o un radical isopropilo.

El compuesto de fórmula (I) puede elegirse de 3-metilfenol (número CAS 108-39-4), 2-metilfenol (número CAS 95-48-7), 4-metilfenol (número CAS 106-44-5) y 4-isopropil-3-metilfenol (número CAS 3228-02-2). Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) es 4-isopropil-3-metilfenol.

- 5 Ventajosamente, 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y el compuesto de cresol de fórmula (I) están presentes en dicha mezcla en un contenido tal que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/compuesto (I) varía de 0,5 a 15, preferiblemente varía de 1 a 15, y más preferiblemente varía de 1 a 12.

Preferiblemente, la mezcla antimicrobiana de acuerdo con la invención contiene 4-isopropil-3-metilfenol.

- 10 La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/compuesto de cresol (I) (en particular, 4-isopropil-3-metilfenol) que varía de 2 a 15, preferiblemente que varía de 2,2 a 15 y más preferiblemente que varía de 2,2 a 12. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre la bacteria gram-positiva *Enterococcus faecalis*.

- 15 La mezcla antimicrobiana puede tener una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/compuesto de cresol (I) (en particular el 4-isopropil-3-metilfenol) que varía de 0,5 a 15, preferiblemente que varía de 1 a 15, preferiblemente que varía de 1 a 12 y más preferiblemente que varía de 2 a 8. Una mezcla de este tipo tiene una buena actividad antimicrobiana sobre levaduras, en particular sobre *Candida albicans*.

- 20 También un objeto de la invención es una composición, en un medio fisiológicamente aceptable, la mezcla antimicrobiana descrita previamente.

- 25 La expresión "medio fisiológicamente aceptable" pretende significar un medio que es compatible con materiales queratínicos humanos tales como la piel, el cuero cabelludo, el cabello y las uñas. Dicho medio puede comprender uno o más ingredientes adicionales, diferentes del compuesto cetónico y del 2-fenoxietanol y/o del alcohol feniletílico y/o del alcohol bencílico y/o del compuesto de cresol de fórmula (I).

- 30 El compuesto 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona puede estar presente en la composición de acuerdo con la invención en un contenido que varía de 0,01% a 5% en peso con respecto al peso total de la composición, preferiblemente que varía de 0,01% a 3% en peso, preferentemente que varía de 0,01% a 2,5% en peso y más preferentemente que varía de 0,01% a 2% en peso.

- 35 La composición puede comprender al menos un ingrediente adicional elegido entre agua, aceites, polioles que contienen de 2 a 10 átomos de carbono, agentes gelificantes, tensioactivos, polímeros filmógenos, colorantes, fragancias, cargas, filtros UV, extractos vegetales, agentes activos cosméticos y dermatológicos y sales.

La composición de acuerdo con la invención puede comprender una fase acuosa.

- 40 La composición puede comprender agua, que puede estar presente en un contenido que varía de 5% a 90% en peso con respecto al peso total de la composición, y preferiblemente que varía de 35% a 75% en peso.

- 45 La composición también puede comprender un poliol que sea miscible en agua a temperatura ambiente (25°C), especialmente elegido de polioles que contienen especialmente de 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente que contienen de 2 a 6 átomos de carbono, tales como glicerol, propilenglicol, 1,3-propanodiol, butilenglicol, pentilenglicol, hexilenglicol, dipropilenglicol, dietilenglicol o diglicerol. Ventajosamente, la composición de acuerdo con la invención comprende 1,3-propanodiol, en particular en un contenido que varía de 0,1% a 20% en peso y preferiblemente que varía de 0,1% a 10% en peso, preferentemente que varía de 0,5% a 5% en peso, con respecto al peso total de la composición.

- 50 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua (O/W), emulsiones agua en aceite (W/O) o emulsiones múltiples (triple: W/O/W u O/W/O), soluciones oleosas, geles oleosos, soluciones acuosas, geles acuosos o composiciones sólidas. Estas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos habituales.

- 55 Las composiciones de acuerdo con la invención pueden ser más o menos fluidas y pueden tener el aspecto de una crema blanca o coloreada, un ungüento, una leche, una loción, un suero, una pasta o una espuma. Se pueden aplicar opcionalmente a la piel en forma de aerosol. También pueden estar en forma sólida, por ejemplo en forma de una barra o de un polvo compacto.

- 60 La composición de acuerdo con la invención puede estar especialmente en forma de:
- un producto de maquillaje, especialmente para maquillar la piel del rostro, el cuerpo o los labios o las pestañas;
  - un gel o loción para después del afeitado; un producto para el afeitado;
  - un desodorante (en barra, de bola o aerosol);
  - una crema depilatoria;
  - una composición de higiene corporal, tal como un gel de ducha o un champú;
- 65

- una composición farmacéutica;
- una composición sólida, tal como un jabón o una barra limpiadora;
- una composición de aerosol que también comprende un propulsor presurizado;
- una loción de fijación del cabello, una crema o gel para el peinado del cabello, una composición de tinte, una composición de ondulación permanente, una loción o un gel para combatir la caída del cabello, o un acondicionador del cabello;
- una composición para el cuidado o la limpieza de la piel.

Un objeto de la invención es también un procedimiento para preparar una composición, especialmente una composición cosmética o dermatológica, que comprende una etapa de mezclar 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona, el alcohol aromático descrito previamente y uno o más ingredientes adicionales, en particular ingredientes cosméticos o dermatológicos tales como los descritos previamente.

La invención se ilustra con mayor detalle en el ejemplo que sigue. Las cantidades de los ingredientes se expresan como porcentajes en peso.

### **Ejemplo 1: Determinación de la actividad antimicrobiana sinérgica como MIC**

La demostración de un efecto de actividad antimicrobiana sinérgica con una mezcla de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona (a la que se alude como sustancia A) y de alcohol aromático (al que se alude como sustancia B) se realiza calculando el índice de sinergia (o índice FIC) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice FIC} = (\text{MIC de A con B} / \text{MIC de A}) + (\text{MIC de B con A} / \text{MIC de B})$$

con:

- MIC de A con B: concentración mínima de producto A en la combinación A + B que posibilita obtener un efecto inhibidor;
- MIC de B con A: concentración mínima de producto B en la combinación A + B que posibilita obtener un efecto inhibidor;
- MIC de A: concentración inhibitoria mínima de producto A solo;
- MIC de B: concentración inhibitoria mínima de producto B solo.

Esta fórmula fue descrita por primera vez en el artículo de F.C. Kull, P.C. Eisman, H.D. Sylwestrowka, y R.L. Mayer, Applied Microbiology 9:538-541, 1961.

Para cada uno de los compuestos ensayado solos, se considera la MIC como la primera concentración que posibilita obtener un porcentaje de crecimiento microbiano menor que o igual a 20%.

En cuanto a las combinaciones ensayadas, la MIC de A con B y la MIC de B con A son las respectivas concentraciones de A y de B en las combinaciones que posibilitan obtener un porcentaje de crecimiento microbiano menor que o igual a 20%.

### **Interpretación del índice FIC:**

Cuando el valor del índice FIC es menor que o igual a 1, se considera que la combinación de compuestos de ensayo tiene un efecto sinérgico.

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes tablas.

La combinación de los compuestos A y B se ensayó en las siguientes cepas o una parte de las mismas: *Aspergillus niger*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*

Se utilizaron la cepa microbiana *Aspergillus niger* ATCC 6275, y una doble concentración de medio de cultivo líquido caldo de Sabouraud complementado con monopalmitato de sorbitan polioxietilenado (20 OE) (Tween 40 de Croda) y Phytigel© BioReagent (es decir, una mezcla de 5 g de Phytigel + 0,6 g de Tween 40 + 60 g de caldo Sabouraud).

Se utilizaron la cepa microbiana *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 y un medio de cultivo líquido de caldo BHI (siglas inglesas de Infusión de Cerebro Corazón) de doble concentración.

Se utilizaron la cepa microbiana *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y un medio de cultivo líquido de caldo nutriente de doble concentración.

Se utilizaron la cepa microbiana *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y un medio de cultivo líquido de caldo nutriente de doble concentración.

Se utilizaron la cepa microbiana *Candida albicans* ATCC 10231 y medio de cultivo líquido caldo Sabouraud de doble concentración.

Se utilizan una microplaca de 96 pocillos y una temperatura de incubación de 32,5°C.

El tiempo de incubación de la microplaca es:

- de 18 a 24 h en condiciones aerobias para *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- de 24 a 30 h en condiciones aerobias para *Aspergillus niger* ATCC 6275 microbiano;
- de 24 a 48 h en condiciones aerobias para *Enterococcus faecalis* ATCC 33186.

## **Ensayos**

Para cada uno de los compuestos:

- A = compuesto 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona
- B = compuesto alcohol aromático

Se preparó una solución madre al 10% (peso/volumen) mezclando 1 g de compuesto en 9 ml de solución acuosa de agar al 1%. Se hicieron diluciones sucesivas con la solución de agar al 1%.

## **Ensayos de compuestos A y B solos**

Se añaden 50 µl de cada una de las soluciones hijas obtenidas que contienen el compuesto A o B a los pocillos de la microplaca. También se añaden a ello 100 µl de caldo nutriente líquido de Sabouraud inoculado a doble concentración con la cepa *Aspergillus niger* y 50 µl de solución acuosa de agar al 1%.

## **Ensayos de compuestos A y B como una mezcla**

Se añaden 50 µl de cada una de las soluciones hijas obtenidas que contienen compuesto A y 50 µl de cada una de las soluciones hijas obtenidas que contienen compuesto B a los pocillos de la microplaca. También se añaden a ello 100 µl de caldo nutriente líquido de Sabouraud inoculado a doble concentración con la cepa *Aspergillus niger*.

## **Control del crecimiento microbiano**

También se preparó un control de crecimiento microbiano positivo. El control positivo del crecimiento microbiano corresponde a una mezcla de 100 µl de solución acuosa de agar al 1% con 100 µl de caldo nutriente líquido de Sabouraud inoculado a doble concentración con la cepa *Aspergillus niger* en ausencia de los compuestos A y B.

## **Control de la absorbancia para compuestos A y B solos**

Se realizó un control de la absorbancia en paralelo sobre los compuestos A y B solos. Este control corresponde a 100 µl de caldo nutriente líquido de Sabouraud estéril de doble concentración + 100 µl de compuesto A o B de doble concentración.

En los tres casos (control de absorbancia, control del crecimiento y ensayo), el volumen final presente en cada uno de los pocillos de la microplaca es de 200 µl.

En los dos casos (de ensayo y de control), el inóculo representa la concentración de la cepa de *Aspergillus niger* presente en el volumen final de los pocillos (200 µl) y se encuentra entre 2 y  $6 \times 10^5$  ufc/ml de *Aspergillus niger*.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada uno de los compuestos A y B solos y en combinación se determinó de manera conocida por medio de mediciones de densidad óptica a una longitud de onda de 620 nm.

El ensayo tal como se describió anteriormente (pruebas, control de absorbancia y control de crecimiento) se realizó de nuevo para ensayar la combinación A + B en las siguientes cepas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

Se obtuvieron los siguientes resultados con el compuesto B1 = 2-fenoxietanol:

**Aspergillus niger**

| Concentraciones<br>testadas en<br>peso (%) | 0 A | 0.0625 A | 0.125 A | 0.25 A |
|--------------------------------------------|-----|----------|---------|--------|
| 0 B1                                       |     | 85       | 47      | 7      |
| 0.0625 B1                                  | 95  | 76       | 37      | 5      |
| 0.125 B1                                   | 89  | 34       | 14      | 2      |

|         |   |   |         |   |
|---------|---|---|---------|---|
|         |   |   | (FIC 1) |   |
| 0.25 B1 | 8 | 3 | 2       | 2 |

| % MIC de A<br>solo | % MIC de B1<br>solo | MIC de cada uno de los compuestos<br>como una mezcla |       | Índice<br>FIC | Relación<br>A/B1 |
|--------------------|---------------------|------------------------------------------------------|-------|---------------|------------------|
|                    |                     | A %                                                  | B1 %  |               |                  |
| 0,25               | 0,25                | 0,125                                                | 0,125 | 1             | 1                |

5

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica de la mezcla:  
0,125% de A y 0,125% de B1, es decir, relación A/B1 = 1

**Enterococcus faecalis**

10

| Concentraciones<br>testadas (en<br>% en peso) | 0 A | 0.0625 A | 0.125 A | 0.25 A          | 0.5 A | 1 A |
|-----------------------------------------------|-----|----------|---------|-----------------|-------|-----|
| 0 B1                                          |     | 82       | 89      | 89              | 75    | 13  |
| 0.0625 B1                                     | 87  | 83       | 87      | 97              | 82    | 34  |
| 0.125 B1                                      | 86  | 90       | 80      | 95              | 73    | 30  |
| 0.25 B1                                       | 84  | 95       | 75      | 83              | 74    | 30  |
| 0.5 B1                                        | 80  | 79       | 68      | 5<br>(FIC 0.75) | 37    | 2   |
| 1 B1                                          | 6   | 6        | 2       | 3               | 2     | -23 |

| % MIC de A<br>solo | % MIC de B1<br>solo | MIC de cada uno de los compuestos<br>como una mezcla |      | Índice<br>FIC | Relación<br>A/B1 |
|--------------------|---------------------|------------------------------------------------------|------|---------------|------------------|
|                    |                     | A %                                                  | B1 % |               |                  |
| 1                  | 1                   | 0,25                                                 | 0,5  | 0,75          | 0,5              |

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica de la mezcla:  
0,25% de A y 0,25% de B1, es decir, relación A/B1 = 0,5

15

**Staphylococcus aureus**

| Concentraciones testadas (en % en peso) | 0 A | 0.0625 A | 0.125 A         | 0.25 A        | 0.5 A |
|-----------------------------------------|-----|----------|-----------------|---------------|-------|
| 0 B1                                    |     | 71       | 57              | 52            | 1     |
| 0.0625 B1                               | 66  | 68       | 62              | 38            | 1     |
| 0.125 B1                                | 73  | 65       | 55              | 17<br>(FIC 2) | 1     |
| 0.25 B1                                 | 58  | 43       | 15<br>(FIC 0.5) | 1<br>(FIC 1)  | 0     |
| 0.5 B1                                  | 1   | 1        | 0               | 1             | 0     |

| % MIC de A solo | % MIC de B1 solo | MIC de cada uno de los compuestos como una mezcla |      | Índice FIC | Relación A/B1 |
|-----------------|------------------|---------------------------------------------------|------|------------|---------------|
|                 |                  | A %                                               | B1 % |            |               |
| 0,5             | 0,5              | 0,25                                              | 0,25 | 1          | 0,5           |

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica para las mezclas:

- 5
- i) 0,25% de A y 0,125% de B1, es decir, relación A/B1 = 2
  - ii) 0,125% de A y 0,25% de B1, es decir, relación A/B1 = 0,5
  - iii) 0,25% de A y 0,25% de B1, es decir, relación A/B1 = 1

**Pseudomonas aeruginosa**

10

| Concentraciones testadas (en % en peso) | 0 A | 0.0625 A         | 0.125 A         | 0.25 A        | 0.5 A        | 1 A |
|-----------------------------------------|-----|------------------|-----------------|---------------|--------------|-----|
| 0 B1                                    |     | 49               | 82              | 116           | 67           | -4  |
| 0.0625 B1                               | 45  | 86               | 118             | 92            | 87           | 27  |
| 0.125 B1                                | 39  | 89               | 82              | 95            | 78           | 16  |
| 0.25 B1                                 | 39  | 16<br>(FIC 0.25) | 14<br>(FIC 0.5) | 10<br>(FIC 1) | 0<br>(FIC 2) | 20  |
| 0.5 B1                                  | 0   | 0                | 0               | 0             | 0            | 65  |

|      |   |   |   |   |   |    |
|------|---|---|---|---|---|----|
| 1 B1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
|------|---|---|---|---|---|----|

| % MIC de A solo | % MIC de B1 solo | MIC de cada uno de los compuestos como una mezcla |      | Índice FIC | Relación A/B1 |
|-----------------|------------------|---------------------------------------------------|------|------------|---------------|
|                 |                  | A %                                               | B1 % |            |               |
| 1               | 0,5              | 0,5                                               | 0,25 | 1          | 0,25          |

15

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica para las mezclas:

- 15
- i) 0,0625% de A y 0,25% de B1, es decir, relación A/B1 = 0,25
  - ii) 0,125% de A y 0,25% de B1, es decir, relación A/B1 = 0,5
  - iii) 0,25% de A y 0,25% de B1, es decir, relación A/B1 = 1
  - iv) 0,5% de A y 0,25% de B1, es decir, relación A/B1 = 2
- 20

**Candida Albicans**

| Concentraciones<br>testadas (en %<br>en peso) | 0 A | 0.025 A          | 0.05 A           | 0.1 A |
|-----------------------------------------------|-----|------------------|------------------|-------|
| 0 B1                                          |     | 48               | 29               | 16    |
| 0.0625 B1                                     | 44  | 26               | 17<br>(FIC 0.75) | 8     |
| 0.125 B1                                      | 22  | 10<br>(FIC 0.75) | 5<br>(FIC 1)     | 1     |
| 0.25 B1                                       | 2   | 1                | 1                | 1     |

| % MIC de A<br>solo | % MIC de B1<br>solo | MIC de cada uno de los compuestos<br>como una mezcla |       | Índice<br>FIC | Relación<br>A/B1 |
|--------------------|---------------------|------------------------------------------------------|-------|---------------|------------------|
|                    |                     | A %                                                  | B1 %  |               |                  |
| 0,1                | 0,25                | 0,05                                                 | 0,125 | 0,75          | 0,2              |

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica para las mezclas:

- i) 0,05% de A y 0,0625% de B1, es decir, relación A/B1 = 0,8
- ii) 0,05% de A y 0,125% de B1, es decir, relación A/B1 = 0,4
- iii) 0,025% de A y 0,125% de B1, es decir, relación A/B1 = 0,2

**Ejemplo 2: Determinación de la actividad antimicrobiana de la mezcla antimicrobiana**

La eficacia antimicrobiana de la mezcla antimicrobiana 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona + 2-fenoxietanol (relación ponderal respectiva de 0,1) se evaluó mediante el método de Ensayo de Desafío.

**Protocolo**

El método del ensayo de desafío está constituido por una contaminación artificial de la muestra con cepas microbianas de la colección (bacterias, levaduras y mohos) y por una evaluación del número de microorganismos revivibles siete días después de la inoculación.

Con el fin de demostrar el efecto de la mezcla antimicrobiana, se comparó la actividad antimicrobiana de una fórmula cosmética que contenía 0,05% de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y 0,5% de 2-fenoxietanol con la misma fórmula sola (control), después de la inoculación con aproximadamente  $10^6$  ufc (unidades formadoras de colonias)/gramo de formulación cosmética.

**Fórmula cosmética**

Se preparó una emulsión de aceite en agua para el cuidado facial con la siguiente composición (contenidos en porcentajes en peso):

|                                                                                                     |              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Triestearato de sorbitán (Span 65 V de Croda)                                                       | 0,9%         |
| Mezcla de mono/diestearato de glicerilo (36/64)/estearato de potasio (Tegin Pellets de Goldschmidt) | 3%           |
| Estearato de polietilenglicol (40 unidades de óxido de etileno)                                     | 2%           |
| <b>4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona</b>                                                        | <b>0,05%</b> |
| <b>2-fenoxietanol</b>                                                                               | <b>0,5%</b>  |
| Propano-1,3-diol                                                                                    | 2%           |
| Mezcla de aceite mineral, cera microcristalina y parafina (Vaseline Blanche Codex 236 de Aiglon)    | 4%           |
| Fracción líquida de manteca de karité (Oleína de Karité de Olvea)                                   | 1%           |
| Ciclopentadimetilsiloxano                                                                           | 5%           |
| Alcohol cetílico                                                                                    | 4%           |
| Aceite de semilla de albaricoque                                                                    | 0,3%         |

|                                                        |       |
|--------------------------------------------------------|-------|
| Poliisobuteno hidrogenado (Parleam de NOF Corporation) | 7,2%  |
| Miristato de miristilo                                 | 2%    |
| Ácido esteárico                                        | 1,2%  |
| Cafeína                                                | 0,1%  |
| Ácido cítrico                                          | 0,2%  |
| Glicerol                                               | 3%    |
| Hidróxido de sodio                                     | 0,05% |
| Agua c.s.                                              | 100%  |

**Fórmula de control A:** Formulación similar a la anterior que contiene 0,05% de 4-(3-etoxi-4- hidroxifenil)butan-2-ona y sin 2-fenoxietanol (0,5% compensado con agua).

5 **Fórmula de control B:** Formulación similar que contiene 0,5% de 2-fenoxietanol y sin 4-(3-etoxi-4- hidroxifenil)butan-2-ona (0,05% compensado con agua).

### **Cultivos de microorganismos**

10 Se utilizaron 5 cultivos puros de microorganismos.

| MICROORGANISMOS                         | Medio de subcultivo | T*   | ATCC  |
|-----------------------------------------|---------------------|------|-------|
| <i>Escherichia coli</i> (Ec)            | Tripto-caseína soja | 35°C | 8739  |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (Ef)       | Tripto-caseína soja | 35°C | 33186 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa)      | Tripto-caseína soja | 35°C | 19429 |
| <i>Candida albicans</i> (Ca)            | Sabouraud           | 35°C | 10231 |
| <i>Aspergillus niger</i> (An)           | Malta               | 35°C | 6275  |
| ATCC = American Type Culture Collection |                     |      |       |

15 Las cepas de bacterias gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), bacteria gram-positiva (*Enterococcus faecalis*), levadura (*Candida albicans*) y moho (*Aspergillus niger*) se inoculan en un medio de subcultivo, respectivamente, el día anterior a la inoculación de las bacterias. y la levadura, y 5 días antes de la inoculación del moho.

El día de la inoculación:

- se prepara una suspensión en diluyente de sal triptona, respectivamente, para las bacterias y la levadura, de manera que se obtenga mediante espectrofotómetro una suspensión con una densidad óptica entre 35% y 45% de luz transmitida a 544 nm;
- para el moho, las esporas se recolectan lavando el agar con 6 a 7 ml de solución de recolección y la suspensión se recupera en un tubo o matraz estéril.

25 Después de homogeneizar la suspensión microbiana, se introducen 0,2 ml de inóculo en cada uno de los frascos de pastillas (las suspensiones se utilizan puras: entre  $1 \times 10^8$  y  $3 \times 10^8$  ufc por ml) y la suspensión microbiana en los 20 g de producto (= formulación cosmética) se homogeneizan a fondo utilizando una espátula.

30 El contenido de microorganismos presentes en el producto corresponde, después de la homogeneización, a una concentración de  $10^6$  microorganismos por gramo de producto, es decir, inoculación al 1% de un inóculo que contiene  $10^8$  microorganismos por ml.

35 Después de 7 días de tiempo de contacto entre los microorganismos y el producto a  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y en la oscuridad, se llevan a cabo diluciones diez veces mayores y se cuenta el número de microorganismos revivibles que quedan en el producto.

### **Resultados**

|                                              | Nº de UFC/gramo de producto a los T7 días |                      |                    |                    |                 |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
|                                              | <i>E. coli</i>                            | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
| Mezcla antimicrobiana                        | < 200                                     | < 200                | < 200              | < 200              | < 200           |
| < 200 UFC: umbral de sensibilidad del método |                                           |                      |                    |                    |                 |

**Ejemplo 3: Determinación de la actividad antimicrobiana sinérgica en MIC sobre la cepa microbiana *Candida albicans***

La demostración de un efecto de actividad antimicrobiana sinérgica con una mezcla de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona (a la que se alude como sustancia A) y de alcohol feniletílico (al que se alude como sustancia B2) se realiza de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 1.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

| Concentra-<br>ciones testadas<br>(en % en peso) | 0 A | 0.025 A | 0.05 A | 0.1 A | 0.2 A |
|-------------------------------------------------|-----|---------|--------|-------|-------|
| 0 B2                                            |     | 85      | 64     | 25    | 3     |
| 0.125 B2                                        | 41  | 23      | 14     | 7     | 0     |

|         |   |   | (FIC 0.75) | (FIC 1) |   |
|---------|---|---|------------|---------|---|
| 0.25 B2 | 7 | 2 | 1          | 0       | 0 |

| % MIC<br>A | MIC<br>B2 | MIC de cada uno de los compuestos como una<br>mezcla |       | Índice<br>FIC |                        |
|------------|-----------|------------------------------------------------------|-------|---------------|------------------------|
|            |           | A %                                                  | B2 %  |               |                        |
| 0,2        | 0,25      | 0,05                                                 | 0,125 | 0,75          | Relación A/B2 =<br>0,4 |

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica para las mezclas:

- i) 0,025% de A y 0,125% de B2, es decir, relación A/B2 = 0,2
- ii) 0,05% de A y 0,125% de B2, es decir, relación A/B2 = 0,4
- iii) 0,1% de A y 0,125% de B2, es decir, relación A/B2 = 0,8

**Ejemplo 4: Determinación de la actividad antimicrobiana de la mezcla antimicrobiana**

La eficacia antimicrobiana de la mezcla antimicrobiana 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona + alcohol 2-feniletílico (relación ponderal respectiva de 0,1) se evaluó mediante el método de Ensayo de Desafío de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 2.

**Fórmula cosmética**

Se preparó una emulsión de aceite en agua para el cuidado facial con la siguiente composición (contenidos en porcentajes en peso):

|                                                                                                     |              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Triestearato de sorbitán (Span 65 V de Croda)                                                       | 0,9%         |
| Mezcla de mono/diestearato de glicerilo (36/64)/estearato de potasio (Tegin Pellets de Goldschmidt) | 3%           |
| Estearato de polietilenglicol (40 unidades de óxido de etileno)                                     | 2%           |
| <b>4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona</b>                                                        | <b>0,05%</b> |
| <b>Alcohol feniletílico</b>                                                                         | <b>0,5%</b>  |
| Propano-1,3-diol                                                                                    | 2%           |
| Mezcla de aceite mineral, cera microcristalina y parafina (Vaseline Blanche Codex 236 de Aiglon)    | 4%           |
| Fracción líquida de manteca de karité (Oleína de Karité de Olvea)                                   | 1%           |
| Ciclopentadimetilsiloxano                                                                           | 5%           |
| Alcohol cetílico                                                                                    | 4%           |
| Aceite de semilla de albaricoque                                                                    | 0,3%         |
| Poliisobuteno hidrogenado (Parleam de NOF Corporation)                                              | 7,2%         |
| Miristato de miristilo                                                                              | 2%           |

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Ácido esteárico    | 1,2%  |
| Cafeína            | 0,1%  |
| Ácido cítrico      | 0,2%  |
| Glicerol           | 3%    |
| Hidróxido de sodio | 0,05% |
| Agua c.s.          | 100%  |

### Resultados

|                                              | Nº de UFC/gramo de producto a los T7 días |                      |                    |                    |                 |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
|                                              | <i>E. coli</i>                            | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
| Mezcla antimicrobiana                        | < 200                                     | < 200                | < 200              | < 200              | < 200           |
| < 200 UFC: umbral de sensibilidad del método |                                           |                      |                    |                    |                 |

### 5 Ejemplo 5: Determinación de la actividad antimicrobiana sinérgica como MIC

La demostración de un efecto de actividad antimicrobiana sinérgica con una mezcla de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona (a la que se alude como sustancia A) y de alcohol bencílico (al que se alude como sustancia B3) se realiza de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 1.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

### Aspergillus niger

| Concentraciones testadas (en % en peso) | 0 A | 0.0625 A        | 0.125 A      | 0.25 A |
|-----------------------------------------|-----|-----------------|--------------|--------|
| 0 B3                                    |     | 86              | 41           | 6      |
| 0.0125 B3                               | 94  | 49              | 24           | 3      |
| 0.25 B3                                 | 31  | 7<br>(FIC 0.75) | 3<br>(FIC 1) | 2      |
| 0.5 B3                                  | 1   | 2               | 1            | 2      |

| % MIC de A solo | % MIC de B3 solo | MIC de cada uno de los compuestos como una mezcla |      | Índice FIC |                      |
|-----------------|------------------|---------------------------------------------------|------|------------|----------------------|
|                 |                  | A %                                               | B3 % |            |                      |
| 0,25            | 0,5              | 0,0625                                            | 0,25 | 0,75       | Relación A/B3 = 0,25 |

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica para las mezclas:

- 0,0625% de A y 0,25% de B3, es decir, relación A/B3 = 0,25
- 0,125% de A y 0,25% de B3, es decir, relación A/B3 = 0,5

**Enterococcus faecalis**

| Concentra-<br>ciones<br>testadas (en<br>% en peso) | 0 A | 0.0625 A        | 0.125 A         | 0.25 A          | 0.5 A        | 1 A |
|----------------------------------------------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----|
| 0 B3                                               |     | 78              | 86              | 92              | 72           | 4   |
| 0.25 B3                                            | 77  | 76              | 79              | 59              | 45           | 6   |
| 0.5 B3                                             | 30  | 6<br>(FIC 0.56) | 3<br>(FIC 0.63) | 2<br>(FIC 0.75) | 3<br>(FIC 1) | 21  |
| 1 B3                                               | 3   | 5               | 2               | 4               | 3            | -2  |

| % MIC<br>de A<br>solo | % MIC<br>de B3<br>solo | MIC de cada compuesto<br>como una mezcla |      | Índice FIC |                       |
|-----------------------|------------------------|------------------------------------------|------|------------|-----------------------|
|                       |                        | A %                                      | B3 % |            |                       |
| 1                     | 1                      | 0.0625                                   | 0.5  | 0.56       | Relación A/B3 = 0.125 |

- 5 Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica de la mezcla:
- i) 0,0625% de A y 0,5% de B3, es decir, relación A/B3 = 0,125
  - ii) 0,125% de A y 0,5% de B3, es decir, relación A/B3 = 0,25
  - iii) 0,25% de A y 0,5% de B3, es decir, relación A/B3 = 0,5
  - iv) 0,5% de A y 0,5% de B3, es decir, relación A/B3 = 1

10

**Ejemplo 6: Determinación de la actividad antimicrobiana sinérgica como MIC**

15 La demostración de un efecto de actividad antimicrobiana sinérgica con una mezcla de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona (a la que se alude como sustancia A) y de 4-isopropil-3-metilfenol (al que se alude como sustancia B4) se realiza de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 1.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

20

**Candida Albicans**

| Concentraciones testadas (en % en peso) | 0 de A | 0.025 A          | 0.05 A          | 0.1 A            | 0.2 A |
|-----------------------------------------|--------|------------------|-----------------|------------------|-------|
| 0 de B4                                 |        | 69               | 63              | 38               | 4     |
| 0.0025 B4                               | 87     | 77               | 63              | 41               | 6     |
| 0.005 B4                                | 82     | 58               | 54              | 28               | 2     |
| 0.01 B4                                 | 73     | 52               | 41              | 18<br>(FIC 0.75) | 2     |
| 0.02 B4                                 | 35     | 18<br>(FIC 0.63) | 8<br>(FIC 0.75) | 3<br>(FIC 1)     | 1     |
| 0.04 B4                                 | 1      | 1                | 1               | 1                | 0     |

| % MIC de A solo | % MIC de B4 solo | MIC de cada compuesto como una mezcla |      | Índice FIC | Relación A/B4 |
|-----------------|------------------|---------------------------------------|------|------------|---------------|
|                 |                  | A %                                   | B4 % |            |               |
| 0.2             | 0.04             | 0.025                                 | 0.2  | 0.63       | 1.25          |

- 5 Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica para las mezclas:
- i) 0,025% de A y 0,02% de B4, es decir, relación A/B4 = 1,25
  - ii) 0,05% de A y 0,02% de B4, es decir, relación A/B4 = 2,5
  - iii) 0,1% de A y 0,02% de B4, es decir, relación A/B4 = 5
  - iv) 0,1% de A y 0,01% de B4, es decir, relación A/B4 = 10

10

**Enterococcus Faecalis**

| Concentraciones testadas (en % en peso) | 0 de A | 0.0625 A | 0.125 A           | 0.25 A           | 0.5 A         | 1 A |
|-----------------------------------------|--------|----------|-------------------|------------------|---------------|-----|
| 0 de B4                                 |        | 42       | 42                | 33               | 34            | 24  |
| 0.0125 B4                               | 45     | 41       | 41                | 37               | 40            | 21  |
| 0.025 B4                                | 44     | 36       | 38                | 30               | 36            | -19 |
| 0.05 B4                                 | 27     | 39       | 12<br>(FIC 0.625) | 11<br>(FIC 0.75) | 11<br>(FIC 1) | -27 |
| 0.1 B4                                  | 23     | -18      | 7                 | 8                | -4            | -90 |

| % MIC de A solo | % MIC de B4 solo | MIC de cada uno de los compuestos como una mezcla |      | Índice FIC | Relación A/B4 |
|-----------------|------------------|---------------------------------------------------|------|------------|---------------|
|                 |                  | A %                                               | B4 % |            |               |
| 1               | 0,1              | 0,125                                             | 0,05 | 0,63       | 1,25          |

Los resultados obtenidos muestran una actividad inhibitoria sinérgica para las mezclas:

i) 0,125% de A y 0,05% de B4, es decir, relación A/B4 = 1,25

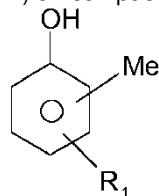
ii) 0,25% de A y 0,05% de B4, es decir, relación A/B4 = 2,5

iii) 0,5% de A y 0,05% de B4, es decir, relación A/B4 = 10

5

## REIVINDICACIONES

1. mezcla antimicrobiana que comprende 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y un alcohol aromático elegido de:
- i) un fenoxialcohol de fórmula  $C_6H_5-O-R-OH$ , designando R un radical hidrocarbonado divalente que tiene 2 o 3 átomos de carbono;
  - ii) alcohol feniletílico;
  - ii) alcohol bencílico;
  - iv) un compuesto de cresol de fórmula (I):



(I)

en que  $R_1$  designa H o un radical isopropilo.

2. Mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el alcohol aromático es un fenoxialcohol de fórmula  $C_6H_5-O-R-OH$ , designando R un radical hidrocarbonado divalente que tiene 2 o 3 átomos de carbono.

3. Mezcla de acuerdo con la reivindicación precedente, caracterizada por que dicho fenoxialcohol se elige de 2-fenoxietanol o 1-fenoxi-2-propanol.

4. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, caracterizada por que dicho fenoxialcohol es 2-fenoxietanol.

5. Mezcla de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que comprende 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y fenoxialcohol en cantidades tales que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/2-fenoxialcohol varía de 0,15 a 3,5, preferiblemente varía de 0,15 a 3,2, y más preferiblemente varía de 0,2 a 3,2.

6. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que tiene una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,3 a 3,2, preferiblemente que varía de 0,3 a 2,4, preferiblemente que varía de 0,3 a 1,4 y más preferiblemente que varía de 0,3 a 1,2.

7. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que tiene una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,4a 0,8, preferiblemente que varía de 0,45 a 0,7, y más preferiblemente que varía de 0,45 a 0,6.

8. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que tiene una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,15 a 1,3, preferiblemente que varía de 0,15 a 0,7, y más preferiblemente que varía de 0,25 a 0,5.

9. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que tiene una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,6 a 1,6, preferiblemente que varía de 0,7 a 1,4, preferiblemente que varía de 0,8 a 1,2 y más preferiblemente que varía de 0,9 a 1,1.

10. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que tiene una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/fenoxialcohol que varía de 0,2 a 3,2, preferiblemente que varía de 0,4 a 3,2, preferiblemente que varía de 0,8 a 3,2, preferiblemente que varía de 1,6 a 3,2, preferiblemente que varía de 0,2 a 2,4, preferiblemente que varía de 0,4 a 2,4, preferiblemente que varía de 0,8 a 2,4 y más preferiblemente que varía de 1,6 a 2,4.

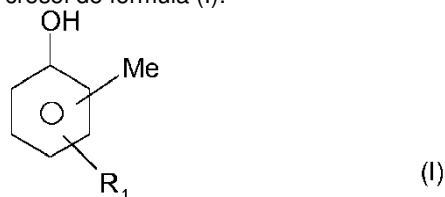
11. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el alcohol aromático es alcohol feniletílico.

12. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que comprende 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y alcohol feniletílico en cantidades tales que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/alcohol feniletílico varía de 0,05 a 1, preferiblemente varía de 0,09 a 0,9, y preferiblemente varía de 0,3 a 0,85.

13. Mezcla antimicrobiana según la reivindicación 1, caracterizada por que el alcohol aromático es alcohol bencílico.

14. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación precedente, caracterizada por que comprende 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y alcohol bencílico en cantidades tales que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/alcohol bencílico varía de 0,1 a 1,5, y preferiblemente varía de 0,1 a 1,2.

15. Mezcla antimicrobiana según la reivindicación 1, caracterizada por que el alcohol aromático es un compuesto de cresol de fórmula (I):



5 en que R<sub>1</sub> designa H o un radical isopropilo.

16. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación precedente, en la que el compuesto de cresol de fórmula (I) se elige de 2-metilfenol, 3-metilfenol, 4-metilfenol y 4-isopropil-3-metilfenol.

10 17. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16, en la que el compuesto de cresol de fórmula (I) es 4-isopropil-3-metilfenol.

15 18. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizada por que comprende 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona y el compuesto de cresol (I) en cantidades tales que la relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/compuesto de cresol (I) varía de 0,5 a 15, preferiblemente varía de 1 a 15, y más preferiblemente varía de 1 a 12.

20 19. Mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizada por que tiene una relación ponderal de 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona/compuesto de cresol (I) que varía de 2 a 15, preferiblemente que varía de 2,2 a 15, y más preferiblemente que varía de 2,2 a 12.

20. Composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, una mezcla antimicrobiana de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 19.

25 21. Composición de acuerdo con la reivindicación precedente, caracterizada por que comprende al menos un ingrediente adicional elegido de agua, aceites, polioles que contienen de 2 a 10 átomos de carbono, agentes gelificantes, tensioactivos, polímeros filmógenos, colorantes, fragancias, cargas, filtros UV, extractos vegetales, agentes activos cosméticos y dermatológicos y sales.

30 22. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 y 21, caracterizada por que la 4-(3-etoxi-4-hidroxifenil)butan-2-ona está presente en un contenido que varía de 0,01% a 5% en peso con respecto al peso total de la composición, preferiblemente que varía de 0,01% a 3% en peso, preferentemente que varía de 0,01% a 2,5% en peso y más preferentemente que varía de 0,01% a 2% en peso.

35 23. Procedimiento de tratamiento cosmético no terapéutico para cuidar y/o maquillar y/o limpiar materiales queratínicos, que comprende la aplicación a dichos materiales queratínicos de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22.

40 24. Procedimiento para conservar una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable, en particular una composición cosmética o dermatológica, caracterizado por que consiste en incorporar a dicha composición una mezcla antimicrobiana tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 19.