



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00179**

(22) Data de depozit: **10/03/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2020** BOPI nr. **12/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2016 BOPI nr. **9/2016**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPL. INDEPENDENȚEI NR. 202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **COROBEA MIHAI COSMIN,
BD. ION MIHALACHE NR. 47, BL. 16A,
SC. A, ET. 4, AP. 9, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VULUGĂ ZINA,
ALEEA DEALUL MĂCINULUI NR.7, BL.D 34,
SC.B, ET.2, AP.22, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **FLOREA DOREL, STR. EMIL RACOVIȚĂ,
NR.2, BL.R18, AP.9, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IORGA MICHAELA DOINA,
STR.AGATHA BÂRSESCU NR.10, BL.V 19,
AP.8, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PANAITESCU DENIS MIHAELA,
PIAȚA MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.8,
SC.B, AP.35, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **ALBU MĂDĂLINA GEORGIANA,
BD. TINERETULUI NR. 21, BL. Z6, SC. 1,
AP. 48, ET. 7, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**WO2012/097302, Durmuş Alpaslan Kaza și
colab. "Proprietățile a doi zeoliți naturali
modificați cu ulei esențial de oregano",
Revista Română de Materiale,
2013,43,48-54.**

(54) **COMPOZIȚIE ANTIBACTERIANĂ ȘI ANTIFUNGICĂ
PENTRU SPECII REZISTENTE LA ACȚIUNEA
ANTIBIOTICELOR, ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**



RO 131367 B1

1 Invenția se referă la o compoziție pe bază de particule anorganice condiționate sub
formă de dispersie coloidală în ser fiziologic și diferite uleiuri esențiale pentru tratamente
3 externe și interne de uz uman sau veterinar, în aplicații farmaceutice, cosmetice, alimentare și
de decontaminare și la un procedeu de obținere a acesteia.

5 Utilizarea compozițiilor pe baza antibioticelor de sinteză este de multe ori o soluție
eficientă împotriva unor patogeni larg răspândiți atât în etiologia bolilor umane cât și în a celor
7 animale. Însă această cale de tratament are și multiple dezavantaje cum ar fi toxicitatea ridicată
la nivel hepatic, creșterea rezistenței patogenilor, scăderea imunității organismului în anumite
9 cazuri.

11 Compozițiile antibacteriene conțin în general substanțe chimice de sinteză cu impact
negativ asupra mediului și cu toxicitate relativ ridicată asupra organismelor vii. Utilizarea unor
componenți naturali atât în cazul componentului activ cât și în cazul sistemului de transport/eli-
13 berare permite reducerea drastică a acestor inconveniente. Atât în domeniul utilizării de uz
uman, cât și în a celui animal biotoleranța este mult mai ridicată față de compușii naturali, ciclul
15 de adaptare dezvoltându-se într-un spectru temporal extins.

17 În acest sens interesul tehnico-științific pentru soluții alternative a crescut și s-a
reorientat către sistemele naturale de combatere existente în metabolismul plantelor. O serie
de extracte au fost studiate până acum în acest sens însă dezavantajele legate de reproducti-
19 bilitate, dar și de concentrațiile relativ reduse ale speciilor active afectează negativ durata
planului de tratament, iar eficiența este de multe ori scăzută pentru bacteriile rezistente la
21 acțiunea antibioticelor de sinteză. O serie de brevete subliniază însă, pentru uleiurile esențiale,
o eficiență mult mai mare împotriva agenților patogeni, de exemplu **WO 2013/083393 A1**,
23 **US 2013/259959 A1**, **EP 2368547 B1**. Și prezenta invenție descrie în compozițiile menționate
uleiuri esențiale izolate din plante, sisteme bogate în substanțe antibacteriene și antifungice cu
25 acțiune superioară bioextractelor primare.

27 Invenția constă în diferite compoziții pe baza uleiurilor esențiale formulate în sisteme de
administrare de tip emulsie stabilizate cu anumite particule solide coloidale, de origine naturală
sau sintetică.

29 Invenția aduce o serie de avantaje în comparație cu emulsiile cunoscute pe bază de
uleiuri esențiale ce presupun molecule de tip emulgator sau surfactant, conform
31 **US 2013/259959 A1**. Deși domeniul emulgatorilor sau surfactanților de uz farmaceutic s-a
dezvoltat intens în ultimii ani, o serie de compuși sunt încă suspecți pentru implicațiile nega-
33 tive asupra sănătății. Majoritatea compușilor de sinteză binecunoscuți din clasa conservanților
chimici au fost interziși pentru formulări farmaceutice sau alimentare. Acțiunea acestora a fost
35 dovedită atât în studii clinice cât și de laborator cu privire la agresivitatea hepatică sau renală.
Reducerea agenților de formulare cu potențial toxic sau alergen atât în domeniul farmaceutic
37 cât și în cel alimentar a fost identificată ca fiind o prioritate în domeniu.

39 Utilizarea și în cazul agenților de formulare în principal a unor compuși naturali sau care
suferă condiționări fizico-chimice minore reprezintă un avantaj major pentru biotoleranța în
aplicațiile biomedicale și alimentare.

41 Utilizarea uleiurilor esențiale ca substitut pentru agenții chimici de sinteză în cadrul
invenției aduce avantaje nu numai în privința toxicității. În ceea ce privește efectul antibacterian,
43 verificat în cultura populară de-a lungul a sute de ani, acestuia i se poate aduce pe post de
contraargument cazuistica clinică mai puțin elaborată din punct de vedere al metodologiilor
45 actuale. În acest context însă, trebuie considerată natura acestor uleiuri care stau la baza
mecanismului de apărare al plantelor împotriva stresului patogenic natural. Procesele biologice
47 de adaptare și de evoluție ale fiecărei specii de plante suferă schimbări permanente și permit
o acțiune eficientă împotriva patogenilor, similar adaptării continue a sistemului imunitar uman

sau animal. În acest sens, cererea de brevet **WO2012/097302** descrie sisteme de furnizare și de purtători pentru compuși moleculari activ, îndeosebi dispersii apoase pentru furnizarea compuşilor moleculari activi care sunt constituite dintr-o fază continuă lichidă sau sub formă de gel, o fază dispersată care cuprinde un substrat hidrofil, un produs intermediar cuprinzând un rest hidrofob și un rest ionic și un agent activ care cuprinde un al doilea rest hidrofob. De asemenea, un studiu efectuat de **Durmuş Alpaslan Kaza și colab. "Proprietățile a doi zeoliți naturali modificați cu ulei esențial de oregano"**, *Revista Română de Materiale*, **2013, 43, 48-54** - prezintă proprietățile morfologice și termice și capacitatea de eliberare a uleiului esențial de oregano din zeoliți modificați cu ulei esențial de oregano.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în creșterea stabilității unor compoziții antibacteriene și antifungice pe bază de uleiuri esențiale sub formă de emulsie, pentru aplicații medicale, cosmetice, alimentare etc.

Compoziția cu rol antibacterian și antifungic pentru aplicații farmaceutice de uz uman și veterinar, cosmetice, alimentare și de decontaminare conform invenției, înlătură detavantajele menționate prin aceea că este constituită din 0,1...15% particule coloidale solide, alese dintre ilit, montmorilonit, particule hibride montmorilonit-silice, restul până la 100% soluție perfuzabilă de clorură de sodiu 9 g/L și un ulei esențial selectat dintre uleiurile de cimbru, rozmarin sau mirt, utilizat în proporție de 110...160%, față de soluția perfuzabilă, proporțiile fiind exprimate în procente gravimetrice.

Procedeele de obținere a compoziției cu rol antibacterian și antifungic pentru specii rezistente la acțiunea antibioticelor, conform invenției, constă în aceea că particulele coloidale solide în proporție de 0,1...15% gravimetric, purificate prin spălări succesive cu apă distilată și uscate prin centrifugare și sterilizate, se supun omogenizării cu soluția perfuzabilă de clorură de sodiu 9 g/L prin agitare mecanică și ultrasonare timp de 30 min, după care se adaugă în picătură, sub agitare, uleiul esențial și se menține agitatea timp de 10...20 min după încheierea adăugării uleiului esențial.

Uleiurile esențiale prezintă un puternic caracter hidrofob din punct de vedere fizico-chimic, astfel utilizările în sisteme apoase pentru industria alimentară sau farmaceutică impun momentan anumite limitări. În același timp costurile obținerii uleiurilor esențiale sunt relativ ridicate, existând un real interes pentru reducerea consumurilor necesare în aplicațiile practice. În cazul prezentei invenții aceste limitări pot fi depășite prin sistemul de condiționare prezentat care presupune obținerea de dispersii apoase.

Sistemele de condiționare (microîncapsulare) utilizate în prezent, **WO 2004098767 A1**, se bazează pe polimeri de sinteză care necesită utilizarea ca intermediari sau agenți finali de poliiizocianati sau poliamine care au un potențial toxic mult mai ridicat decât particulele coloidale naturale utilizate de prezenta invenție. Sistemele de încapsulare cunoscute pe bază de lipozomi din **DE 199922193 A1** prezintă de asemenea dezavantajele încărcării cu o cantitate redusă de agent bioactiv hidrofob și utilizării solvenților organici pentru obținerea lipozomilor. Invenția de față înlătură aceste dezavantaje prin utilizarea particulelor coloidale, în principal naturale cu suprafață specifică foarte mare, condiționarea având loc pe suprafață și nu prin metode de încapsulare. În acest fel și eliberarea principiului bioactiv este îmbunătățită, desorbția la locul țintă realizându-se de pe suprafața agentului de condiționare și nu prin permeație.

Conform invenției se obțin diferite formulări cu acțiune antibacteriană, antifungică și antiinflamatoare, ce presupun formarea de emulsii stabilizate prin intermediul particulelor solide anorganice. Compoziția presupune un sistem heterogen care permite eliberarea eficientă a compusului bioactiv curativ. Prin utilizarea acestui sistem se pot obține rezultate superioare pentru inhibarea agenților patogeni, în comparație cu compusul bioactiv pur. Invenția aduce avantaje atât în privința consumurilor specifice de administrare cât și în ce privește efectul antibacterian sau antifungic (după caz).

RO 131367 B1

1 Emulsiile descrise în această invenție au o structură similară cu emulsiile de tip
Pickering. Acestea constau în dispersii cu aspect microscopic omogen, formate plecând de la
3 două lichide nemiscibile ce conțin particule coloidale solide capabile să asigure pentru o
anumită durată de timp stabilizarea amestecului.

5 Puritya uleiului esențial este de 99%. Mineralele argiloase sunt structuri stratificate de
filosilicați utilizate ca atare fără modificări cu agenți de intercalare compuși organici sau de altă
7 natură. Particulele hibride montmorilonit-silice sunt structuri anorganice filamentare (de peste
1 micron lungime) atașate covalent pe structuri lamelare de montmorilonit natural.

9 Compoziția antibacteriană și antifungică pentru specii rezistente la acțiunea antibioticelor
conform invenției este constituită din următoarele componente, exprimate în procente gravi-
11 metriche: (A) 0,1...15% particule coloidale solide alese dintre illit, montmorillonit, particule hibride
montmorilonit-silice obținute conform referinței **Coroșea și colab. „Silica nanowires obtained
13 on clay mineral layers and their influence on mini-emulsion polymerisation”, Appl. Clay
Sci., 2014, 95: 232-242**, (B) restul până la 100% soluție perfuzabilă de clorură de sodiu 9 g/l
15 (ser fiziologic) și (C) între 110...160%, față de componentul (B), ulei esențial, ales dintre uleiurile
esențiale de cimbru, mirt și rozmarin.

17 Procedul de obținere a compoziției antibacteriene și antifungice pentru specii rezistente
la acțiunea antibioticelor constă în aceea că, în prealabil, componentul A se purifică prin spălări
19 succesive cu apă distilată și centrifugare, pulberea rezultată fiind supusă sterilizării. Între
0,1...15% grav. din componentul A sterilizat se omogenizează cu componentul B (soluție
21 perfuzabilă de clorură de sodiu 9 g/L) prin agitare mecanică și ultrasonare timp de 30 min, în
baie de ultrasunete, cu termostatare. Din dispersia omogenă astfel obținută se prelevează între
23 100...250 ml după care se supune agitării utilizând un agitator magnetic termostatat la turație
întă (900 rpm). Sub agitare la turația menționată se adăugă în picătură componentul C. După
25 încorporarea întregii cantități de C, se continuă agitarea între 10...20 min. Se utilizează un
raport gravimetric între 1,1 și 1,6 component C față de componentul B. Emulsia astfel obținută
27 se sigilează în recipiente sterile și se poate utiliza ca atare.

29 Determinarea efectului antibacterian și antifungic al compozițiilor (emulsiile descrise mai
sus) s-a realizat utilizând teste de susceptibilitate prin difuzie cu dischete, utilizând metoda
Kirby-Bauer adaptată (**Bauer și colab. „Antibiotic susceptibility testing by a standardized
31 single disk method”, Am. J. Clin. Path. 1966, 45, 493-496**). Materialul patogenic a fost
recoltat direct de la subiecți umani aflați în stare critică, cu infecții severe, din unitatea de terapie
33 intensivă (cu tulpini rezistente la tratamentul cu antibiotice). Cultura microbiologică s-a utilizat
după o metodă tipică (0,5 McFarland standard) cu depunere din suspensie pe plăci eu agar în
35 vase Petri. După ce a fost înlăturat excesul, s-au utilizat dischete sterile (eu diametrul de 5 mm)
în care s-a impregnat compoziția pentru analiză. După incubare la 37°C, au fost măsurate
37 diametrele de inhibiție la 24 și 48 h. Pentru *Enterococcus faecalis* s-a utilizat agar cu sânge de
berbec 5%. În fig. 1, se evidențiază rezultatele obținute în urma testelor de mai sus, utilizând
39 compoziția, pe domeniul descris în invenție, respectiv acțiunea acesteia asupra diferitelor culturi
patogenice (*Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli*, *P.*
41 *Aeruginosa* și *S. Aureus*).

Invenția prezintă următoarele avantaje generale:

- 43 - permite obținerea unor compoziții cu proprietăți antibacteriene superioare uleiurilor
esențiale ca atare;
- 45 - permite obținerea unor compoziții prin utilizarea integrală sau parțială a compușilor
naturali;
- 47 - îmbunătățește forma de administrare în medii apoase;
- permite reducerea consumului de uleiuri esențiale în aplicații antibacteriene;

RO 131367 B1

- permite atingerea unor performanțe superioare antibioticelor de sinteză pentru etiologia implicată de următorii patogeni: *Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa* și *S. Aureus*. 1
3

În continuare se prezintă următoarele exemple:

Exemplul 1 5

Componentul A este un mineral argilos de tip ilit. Acesta se purifică prin spălări succesive cu apă distilată și centrifugare, pulberea rezultată fiind supusă sterilizării. 20 grame din componentul A sterilizat se omogenizează cu 1000 ml component B (soluție perfuzabilă de clorură de sodiu 9 g/L) prin agitare mecanică și ultrasonare timp de 30 min în baie de ultrasunete cu termostatare. Din dispersia omogenă astfel obținută se prelevează o cantitate de 160 ml după care se supune agitării utilizând un agitator magnetic termostatat la turație înaltă 900 rpm. Sub agitare la turația menționată are loc adăugarea în picătură a componentului C. Componentul C este ulei esențial de *Thymus vulgaris*. După încorporarea întregii cantități de component C, se continuă agitarea timp de 15 min. Se utilizează un raport gravimetric de 1,5 component C față de dispersia omogenă. Emulsia astfel obținută se sigilează în recipiente sterile și se poate utiliza ca atare. Utilizând această compoziție se obține un efect antibacterian mărit cu peste 30% (față de uleiul concentrat) împotriva *Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa* și *S. Aureus*. 7
9
11
13
15
17

Exemplul 2 19

Compoziția a fost obținută ca în procedeul descris în exemplul 1, cu excepția faptului că uleiul folosit a fost *Myrtus communis*. 21

Utilizând această compoziție se obține un efect antibacterian mărit cu peste 30% (față de uleiul concentrat) împotriva *Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *E. Coli*, și *S. Aureus*. 23

Exemplul 3 25

Compoziția a fost obținută ca în procedeul descris în exemplul 1, cu excepția faptului că uleiul folosit a fost *Rosmarinus officinalis*. Utilizând această compoziție se obține un efect antibacterian mărit cu peste 30% (față de uleiul concentrat) împotriva *Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *E. Coli*, și *S. Aureus*. 27

Exemplul 4 29

Compoziția a fost obținută ca în procedeul descris în exemplul 1, cu excepția faptului că pentru Componentul A se utilizează un mineral argilos de tip montmorilonit, iar Componentul C este ulei esențial de *Thymus vulgaris*. Utilizând această compoziție se obține un efect antibacterian mărit cu peste 50% (față de uleiul concentrat) împotriva *Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa* și *S. Aureus*. 31
33

Exemplul 5 35

Compoziția a fost obținută ca în procedeul descris în exemplul 4, cu excepția faptului că uleiul folosit este ulei esențial de *Rosmarinus officinalis*. Utilizând această compoziție se obține un efect antibacterian mărit cu peste 40% (față de uleiul concentrat) împotriva *Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *E. Coli* și *S. Aureus*. 37
39

Exemplul 6 41

Compoziția a fost obținută ca în procedeul descris în exemplul 1, cu excepția faptului că pentru Componentul A se folosesc particule hibride montmorilonit-silice conform rețetei din literatură (**Corobea și colab. „Silica nanowires obtained on clay mineral layers and their influence on mini-emulsion polymerisation**), *Appl. Clay Sci.*, **2014**, **95**: 232-242), iar componentul C este ulei esențial de *Thymus vulgaris*. Utilizând această compoziție se obține un efect antibacterian mărit cu peste 40% (față de uleiul concentrat) împotriva *Aspergillus spp.*, *C. Albicans*, *Enterobacter*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa* și *S. Aureus*. 43
45
47

RO 131367 B1

Revendicări

1

3

1. Compoziție cu rol antibacterian și antifungic pentru specii rezistente la acțiunea antibioticelor, pentru aplicații farmaceutice de uz uman și veterinar, cosmetice, alimentare și de decontaminare, **caracterizată prin aceea că**, este constituită din 0,1...15% particule coloidale solide, alese dintre ilit, montmorilonit, particule hibride montmorilonit-silice, restul până la 100% soluție perfuzabilă de clorură de sodiu 9 g/L și un ulei esențial selectat dintre uleiurile de cimbru, rozmarin sau mirt, utilizat în proporție de 110...160%, față de soluția perfuzabilă, proporțiile fiind exprimate în procente gravimetrice.

9

11

2. Procedeu de obținere a compoziției cu rol antibacterian și antifungic pentru specii rezistente la acțiunea antibioticelor definită în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, particulele coloidale solide în proporție de 0,1...15% gravimetric, purificate prin spălări succesive cu apă distilată, uscate prin centrifugare și sterilizate, se supun omogenizării cu soluția perfuzabilă de clorură de sodiu 9 g/L prin agitare mecanică și ultrasonare timp de 30 min, după care se adaugă în picătură, sub agitare, uleiul esențial și se menține agitarea timp de 10...20 min după încheierea adăugării uleiului esențial.

13

15

