



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00678**

(22) Data de depozit: **29/10/2020**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/10/2023** BOPI nr. **10/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. **3/2021**

(73) Titular:

- **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
ȘOS.PANDURI NR.90, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA
MATERIALELOR (INCDFM),**
STR.ATOMIȘTILOR, NR.405A, CP.MG-7,
MĂGURELE, IF, RO;
- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI**
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **LUPȘA MĂDĂLINA,** STR.STRĂMOȘILOR
NR.8, BL.P20, SC.A, AP.5, ET.1, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **POPA MARCELA,**
STR. GEORGE VÂLSAN, NR.6, BL.65, SC.2,
AP.99, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- **CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,**
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

- **MĂRUȚESCU LUMINIȚA GABRIELA,**
ALEEA LT. GHEORGHE STĂLPEANU,
NR.2, BL.2, SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **BĂDICĂ PETRE, BD. DINICU GOLESCU**
NR. 37, SC. B, ET. 3, AP. 48, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **BATALU NICOLAE- DAN,**
ALEEA POLITEHNICII NR. 4, BL. 4, SC. B,
ET. 4, AP. 30, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
- **GRIGOROȘCUȚĂ MIHAI ALEXANDRU,**
STR.VALEA OLTULUI NR.24, BL.D31, SC.B,
ET.1, AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
- **BURDUȘEL MIHAIL, BD.UNIRII, NR.64,**
BL.K4, SC.2, ET.2, AP.39, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
- **ALDICA GHEORGHE VIRGIL,**
ALEEA RAMNICEI, NR.2, BL.M6, AP.66,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 133974 A0; WO 2004/054518 A1

(54) **UTILIZAREA DIBORURII DE MAGNEZIU CA AGENT
ANTIMICROBIAN ÎNTR-O COMPOZIȚIE DE APĂ DE GURĂ**

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

1 Prezenta invenție se referă la utilizarea diborurii de magneziu ca agent antimicrobian
într-o compoziție de apă de gură în care este prezentă clorhexidina, cei doi agenți anti-
3 microbieni având un efect sinergic în inhibarea dezvoltării bacteriilor patogene la nivelul
cavității orale, contribuind astfel la menținerea stării de sănătate a acesteia.

5 Afecțiunile dentare sunt cele mai comune probleme de sănătate, iar evenimentul pri-
mar care contribuie la inițierea patologiei dentare este formarea plăcii bacteriene. *The Global*
7 *Burden of Disease Study*, 2016 estimează că afecțiunile dentare afectează cel puțin 3,58 de
miliarde de persoane din întreaga lume, cea mai frecventă patologie fiind cariogeneza.

9 Cavitata bucală oferă un micromediu adecvat ce favorizează colonizarea și
dezvoltarea bacteriilor. Saliva prezintă un pH optim pentru dezvoltarea bacteriilor, cuprins
11 între 6,5-7,5. Cu ajutorul salivei bacteriile sunt hidratate și dobândesc substanțele nutritive
necesare metabolismului (Lim și colab., 2017, *Theranostics*, 7(17), 4313-4321). Saliva are
13 un rol important și în apărarea organismului împotriva agenților patogeni datorat conținutului
de factori antimicrobieni, precum peptidele antimicrobiene, lizozimul, lactoferina etc. Tempe-
15 ratura de 37°C oferă de asemenea un habitat propice dezvoltării microbiene (Lim și colab.,
2017, *Theranostics*, 7(17), 4313-4321).

17 Au fost identificate o varietate de filumuri și genuri bacteriene, care formează
microbiomul oral și care colonizează suprafețele dentare, gingiile, suprafața linguală, obrajii,
19 buzele, palatul dur și moale (Viganò și colab., 2018, *Acta Scientific Microbiology*, 1.8, 17-
22). Suprafața dinților reprezintă principalul situs de formare a plăcii dentare. Etapele de
21 formare a plăcii bacteriene sunt: aderența, proliferarea, formarea de microcolonii, formarea
biofilmului și maturizarea acestuia (Wolf și Hassell, 2006, *Georg Thieme Verlag KG*, 24-
23 30). Primii colonizatori sunt speciile aerobe sau facultativ anaerobe, care consumă rapid
oxigenul, rezultând un mediu anaerob (Lazăr și colab., 2017, *IntechOpen DOI:*
25 **10.5772/intechopen.69959**).

27 Microbiota orală diferă de la individ la individ și se diversifică de la primele ore după
naștere, continuând odată cu înaintarea în vârstă. La nivelul cavității bucale sunt prezente
microorganisme de tip *Archaea* (microorganisme metanogene), *Bacteria*
29 (*Absconditabacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*,
Cyanobacteria, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gracilibacteria*, *Proteobacteria*, *Saccharibacteria*,
31 *Spirochaetes*, *Synergistetes*, WPS-2) (Chen și colab., 2010, *Database*, Vol. 2010, **Article**
ID baq013, doi: **10.1093/database/baq013**), fungi care aparent sunt predominanți la nivelul
33 cavității orale (*Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*,
Fusarium și *Cryptococcus*) (Bucur Popa, 2015, **Teză de doctorat, București**), protozoare
35 (*Entamoeba gingivalis* și *Trichomonas tenax*) (Bucur Popa, 2015).

37 Placa bacteriană se dezvoltă excesiv, ca urmare a igienei orale necorespunzătoare
și a unui stil de viață nesănătos: spre exemplu consumul crescut de carbohidrați permite
dezvoltarea bacteriilor cariogene, precum *Streptococcus mutans*. Înaintarea în vârstă contri-
39 buie la modificarea microbiotei orale prin faptul că pierderea danturii și înlocuirea acesteia
cu proteze orale din diferite materiale favorizează colonizarea cu tulpini patogene.

41 Eficientizarea și revizuirea produselor pentru tratamentele stomatologice cu ajutorul
unor noi ingrediente active reprezintă o posibilă soluție și prezenta invenție se încadrează
43 în această categorie.

45 Prevenirea și combaterea colonizării microbiene și formării biofilmelor în cavitatea
orală este o problemă de interes general, căutarea și aplicarea unor noi substanțe active, cu
activitate antibacteriană devenind o prioritate. Mai mult, utilizarea necontrolată a antibioticelor
47 a condus la creșterea constantă a ratei de rezistență la antibiotice, care în prezent afectează

RO 134808 B1

și reprezentanții microbiotei orale, mulți agenți patogeni bacterieni orali prezentând rezistență multiplă la antibiotice (MDR). Rezistența genetică este amplificată de rezistența fenotipică a celulelor microbiene incluse în biofilmul plăcii dentare. Pe de altă parte, rata introducerii în terapie a unor noi medicamente cu efect antibiotic este net inferioară ratei de selecție a unor noi tulpini bacteriene rezistente (**Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J., 2009 Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, Clin Infect Dis 48 1-12**).

Pe de altă parte, administrarea unor medicamente pentru anumite boli sistemice sau împotriva unor afecțiuni dentare (antibioticele administrate în cazul periodontitei) poate contribui la apariția unor bacterii orale rezistente la antibiotice, necesitând dezvoltarea de noi soluții pentru prevenirea și tratarea afecțiunilor cavității orale cu implicarea plăcii dentare. Clorhexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) a fost introdusă ca agent antimicrobian în tratamentele stomatologice în 1960, fiind adesea utilizată ca ingredient activ în apa de gură, mai ales sub formă de digluconat în concentrație de 0,2% și 0,12% (**Hoffmann și colab., 2001, Clin. OralInvestig., 5, 89-95; Cieplik și colab., 2019, Front. Microbiol., 10, 587**). Chlorhexidina are atât proprietăți bacteriostatice, cât și bactericide, fiind recomandată în afecțiunile periodontale, pentru curățarea și protecția gingiilor. Clorhexidina inhibă, de asemenea, dezvoltarea plăcii dentare (**Schroder și colab., 1969, Hans Huber, Berlin, 145-172; Loe și colab., 1972, Scand. J. Dent Res. 80(1), 1-9; Vandana și colab., Intern. J. Adv. Res. (2016), 4(7), 1321-1328**). Timpul de acțiune recomandat este de 30 sau 60 s, fiind determinat de rata de adsorbție a antisepticelor pe suprafețele orale (50% din cantitatea de clorhexidina se adsoarbe în 15 s, însă rata de adsorbție poate diferi de la un individ la altul) (**Van der Weijden și colab., 2005, J. Clin. Periodontol. 32(1), 89-9**).

Diborura de magneziu (MgB_2) sub formă de pulbere, corp solid sau acoperire prezintă activitate antibacteriană [**RO 133974 A0**], inhibă colonizarea microbială și formarea biofilmelor microbiene. Testele de laborator pe microorganisme izolate de la pacienți cu diferite patologii orale recomandă MgB_2 ca ingredient activ ce poate fi utilizat ca alternativă sau împreună cu substanțele cunoscute pentru obținerea unor noi produse cu eficiență sporită, utilizate în tratamentele stomatologice.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în utilizarea diborurii de magneziu ca agent antimicrobian într-o compoziție de apă de gură care conține clorhexidină.

Utilizarea diborurii de magneziu ca agent microbial într-o apă de gură care conține clorhexidină înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că concentrațiile minime inhibitorii ale amestecului MgB_2 :apă de gură cu clorhexidină față de tulpinile bacteriene, sunt cuprinse între 0,00005%:1,25 mg/ml și 0,00004%:10 mg/ml, iar cele de eradicare ale biofilmului microbial sunt cuprinse între 0,00000039%:0,009 mg/ml și 0,0004%:10 mg/ml.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- adăugarea MgB_2 ca ingredient activ în apa de gură conduce la obținerea unui efect inhibitor antibacterian de sine stătător, dar mai ales sinergic cu cel al clorhexidinei, care (i) va preveni în mod eficient colonizarea și formarea biofilmului plăcii dentare și (ii) va diminua rezistența bacteriilor componente ale plăcii dentare la antisepticele clasice;

- MgB_2 este un material biodegradabil și biocompatibil.

Se dau în continuare câteva exemple de ilustrare ale invenției pe baza fig. 1 și tabelului 1, în care:

- fig. 1, reprezintă spectrul de difracție de raze X pentru pulberea de MgB_2 . Pulberea conține faza majoritară MgB_2 (faza 1) și faze secundare de tip MgO (faza 2) și Mg (faza 3) în raporturile MgB_2 : MgO : Mg - 97:1,8:1,2% g;

RO 134808 B1

1 - tabelul 1, prezintă valorile CMI și CMEB obținute pentru MgB_2 în soluție, apă de
gură comercială cu clorhexidină (CHL) și pentru amestecul de apă de gură cu clorhexidină
3 și MgB_2 (CHL + MgB_2).

Invenția propune o rețetă de apă de gură pentru uz stomatologic în care ingredientele
5 active sunt un amestec de clorhexidină și MgB_2 cu eficiență ridicată, datorată efectului
sinergic, împotriva colonizării și formării biofilmelor microbiene.

7 Brevetul identifică și propune un produs ce poate fi utilizat ca apă de gură și/sau
soluție dezinfectantă pentru proteze dentare, ce conține un amestec de clorhexidină și
9 diborură de magneziu (MgB_2) ca ingredient activ cu eficiență sinergică față de creșterea
planctonică și sub formă de biofilme, în special a bacililor Gram pozitivi și a levurilor.

11 Pulberea de MgB_2 (fig. 1), conținând faza principală MgB_2 (97% g) și două faze
secundare MgO (1,8% g) și Mg (1,2% g), a fost amestecată cu apa de gură comercială cu
13 clorhexidină (0,2% g/vol), la o concentrație de 10 μ g/ml. Menționăm faptul că fazele
secundare Mg și MgO sunt materiale biocompatibile și biodegradabile. Ca referințe s-au
15 utilizat apa de gură și o soluție de apă cu adaos de pulbere de MgB_2 cu concentrația 10
 μ g/ml. Pentru testarea produselor, apa de gură cu clorhexidină și, respectiv, amestecul de
17 apă de gură și MgB_2 au fost diluate (10 diluții zecimale seriale, plecând de la o soluție stoc
de clorhexidină, diluată 1/500 și, respectiv, o soluție de diborură de magneziu cu concentrația
19 de 10 mg/ml, în amestec de 1:1) în mediu lichid repartizat în microplăci cu 96 de godeuri.
Ulterior, godeurile conținând diferite diluții zecimale au fost însămânțate cu suspensii
21 bacteriene cu densitatea de 10^6 UFC/ml. Plăcile au fost incubate la temperatura de 37°C
pentru 24 h. Absorbanta fiecărei probe a fost citită la spectrofotometru, la lungime de undă
23 de 620 nm, pentru stabilirea valorii concentrației minime inhibitorii (CMI). Ulterior, pentru
determinarea concentrației minime de eradicare a biofilmului (CMEB) au fost parcurse
25 următoarele etape: golirea conținutului godeurilor, spălare cu apă fiziologică sterilă pentru
a îndepărta bacteriile neadherente, fixare timp de 5 min cu metanol absolut, colorare cu cristal
27 violet timp de 15 min, clătire abundentă cu apă de robinet, repunere în suspensie cu acid
acetic 33%, citirea absorbantei la 490 nm. Toate testele au fost realizate în duplicat.

29 Valorile CMI și CMEB pentru tulpinile bacteriene puse în contact cu soluția apoasă
de MgB_2 , apa de gură cu clorhexidină și amestecul dintre acestea sunt prezentate în
31 tabelul 1.

33 Valorile CMI obținute prin testarea acțiunii MgB_2 asupra diferitelor tulpini bacteriene
au relevat o activitate inhibitorie asupra streptococilor (0,0009 mg/ml), levurilor
(0,00078 mg/ml) și asupra bacililor Gram negativi non-fermentativi (0,0039 mg/ml). Bacilii
35 Gram pozitivi au fost sensibili la concentrații mai ridicate, de 0,31 mg/ml, în timp ce
enterobacteriile la o concentrație de 0,15 mg/ml, diferențele între valorile CMI datorându-se,
37 cel puțin parțial, structurii diferite a peretelui celular microbial la diferite microorganisme.

39 Valorile CMI obținute pentru apa de gură comercială cu clorhexidină (0,00005%) au
indicat o eficiență crescută în cazul streptococilor. Sensibilitatea bacililor Gram pozitivi și a
levurilor la această soluție a fost observată la concentrația de 0,0001%, în timp ce
41 enterobacteriile și bacilii Gram negativi non-fermentativi au fost sensibili la o concentrație mai
mare de clorhexidină, respectiv de 0,0002%.

43 În ceea ce privește rezultatele CMI obținute pentru amestecul de MgB_2 + clorhexidină,
valorile obținute au relevat faptul că dintre toate grupurile bacteriene testate cel mai sensibil
45 grup a fost cel al bacililor Gram pozitivi (0,0005% + 1,25 mg/ml), urmat de grupul levurilor
(0,002% + 5 mg/ml), în timp ce grupurile de bacili Gram negativi non-fermentativi,
47 enterobacterii și streptococi au fost mai rezistente la acțiunea amestecului de MgB_2 și CLH
(0,0004% g + 10 mg/ml).

RO 134808 B1

Valorile CMEB au fost egale cu valorile CMI pentru MgB₂ în soluție și apa de gură cu clorhexidină, sau au indicat chiar valori mai mici decât cele CMI pentru amestecul dintre cele două soluții, sugerând că substanțele testate au un potențial anti-biofilm ridicat, iar prezența, în amestec, de clorhexidină + MgB₂ în apa de gură are efect sinergic antimicrobian.

Prin urmare, invenția propusă poate fi utilizată ca apă de gură, în tratamentele stomatologice, dar și ca soluție dezinfectantă pentru protezele mobile, pentru a evita colonizarea microbiană și formarea biofilmelor formate de bacterii precum:

I. bacili Gram negativi non-fermentativi din genurile *Pseudomonas* și *Acinetobacter* (predominant) *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Agrobacterium* și *Pseudoxanthomonas*;

II. bacili Gram negativi fermentativi aparținând genurilor *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Raoultella*, *Serratia*, *Pantoea*, *Pasteurella*, *Vibrio* și *Aeromonas*;

III. bacili Gram pozitivi aparținând genurilor *Actinomyces* și *Bacillus* (predominant), *Lysinibacillus* și *Corynebacterium*;

IV. coci Gram pozitivi aerobi din genurile *Staphylococcus* (predominant), *Micrococcus*; v. coci Gram pozitivi anaerobi reprezentați de genurile *Streptococcus*, *Enterococcus* și *Aerococcus*;

V. alte bacterii anaerobe din genurile: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Gemella*, *Gardnerella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* și *Leuconostoc*;

VI. tulpinile levurice aparținând predominant genului *Candida* și *Magnusiomyces*.

Aplicarea în diferite aplicații stomatologice/orale va ține cont de:

1. Concentrațiile minime inhibitorii ale MgB₂ față de tulpinile testate sunt cuprinse între 0,009 și 0,31 mg/ml, iar cele de eradicare ale biofilmului între 0,009 și 0,625 mg/ml.

2. Concentrațiile minime inhibitorii ale amestecului (MgB₂:apă de gură comercială cu clorhexidină) față de tulpinile testate sunt cuprinse între (0,00005% g:1,25 mg/ml) și (0,0004% g:10 mg/ml), iar cele de eradicare ale biofilmului între (0,00000039% g:0,009 mg/ml) și (0,0004% g:10 mg/ml).

6. Modul în care invenția este susceptibilă de a fi aplicată industrial

Amestecurile (soluțiile) lichide, geluri etc, pe bază de MgB₂, care prin aplicarea acestora pe suprafețele orale scad capacitatea de colonizare microbiană și prezintă o activitate eficientă împotriva formării biofilmelor microbiene, se pot adapta la diferite aplicații în stomatologie (curățarea suprafețelor orale, dezinfectare, tratarea infecțiilor periodontale etc.) sau pentru igiena bucală personală și dezinfectarea protezelor dentare.

Valorile CMI și CMEB obținute pentru MgB₂ în soluție, apă de gură comercială cu clorhexidină (CHL) și pentru amestecul de apă de gură cu clorhexidină și MgB₂ (CHL + MgB₂)

Tabelul 1

Grup de microorganisme	MgB ₂ /H ₂ O		CHL		CHL + MgB ₂	
	CMI (A 600 nm)	CMEB (A 490 nm)	CMI (A 600 nm)	CMEB (A 490 nm)	CMI (A 600 nm)	CMEB (A 490 nm)
Enterobacteriaceae	0,15 mg/ml	0,078 mg/ml	0,0002%g	0,0002%g	0,0004%g 10 mg/ml	0,00000039%g 0,009 mg/ml
Bacili Gram-negativi nonfermentativi	0,039 mg/ml	0,009 mg/ml	0,0002%g	0,0002%g	0,0004%g 10 mg/ml	0,00000078%g 0,039 mg/ml
Bacili Gram-pozitivi	0,31 mg/ml	10 mg/ml	0,0001%g	0,0002%g	0,00005%g 1,25 mg/ml	0,0004% g 10 mg/ml

Tabelul 1 (continuare)

Grup de microorganisme	MgB ₂ /H ₂ O		CHL		CHL + MgB ₂	
	CMI (A 600 nm)	CMEB (A 490 nm)	CMI (A 600 nm)	CMEB (A 490 nm)	CMI (A 600 nm)	CMEB (A 490 nm)
Streptococi	0,009 mg/ml	10 mg/ml	0,00005%g	0,0000125 %g	0,0004%g 10 mg/ml	0,00005%g 1,25 mg/ml
Levuri	0,078 mg/ml	0,31 mg/ml	0,0001%g	0,0004%g	0,0002%g 5 mg/ml	0,0004%g 10 mg/ml
Bacterii anaerobe	0,31 mg/ml	0,625 mg/ml	-	-	-	-

Notă: Identificarea de certitudine (prin tehnica MALDI TOF MS) a tulpinilor bacteriene izolate de la pacienți a evidențiat:

(I) bacili Gram negativi non-fermentativi de tip *Pseudomonas* și *Acinetobacter* (predominant) *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Agrobacterium* și *Pseudoxanthomonas*; bacili Gram negativi fermentativi de tip *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Ewingella*, *Raoultella*, *Serratia*, *Pantoea*, *Pasteurella*, *Vibrio* și *Aeromonas*.

(II) bacili Gram pozitivi de tip *Actinomyces* și *Bacillus* (predominant), *Lysinibacillus* și *Corynebacterium*.

(III) cocii Gram pozitivi aerobi de tip *Staphylococcus* (predominant), *Micrococcus*; cocii Gram pozitivi anaerobi au fost reprezentați de genurile *Streptococcus*, *Enterococcus* și *Aerococcus*.

(IV) bacterii anaerobe: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Gemella*, *Gardnerella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* și *Leuconostoc*.

(V) tulpinile levurice au aparținut predominant genului *Candida* și *Magnusiomyces*.

(VI) tulpinile levurice aparținând predominant genului *Candida* și *Magnusiomyces*.

RO 134808 B1

Revendicare

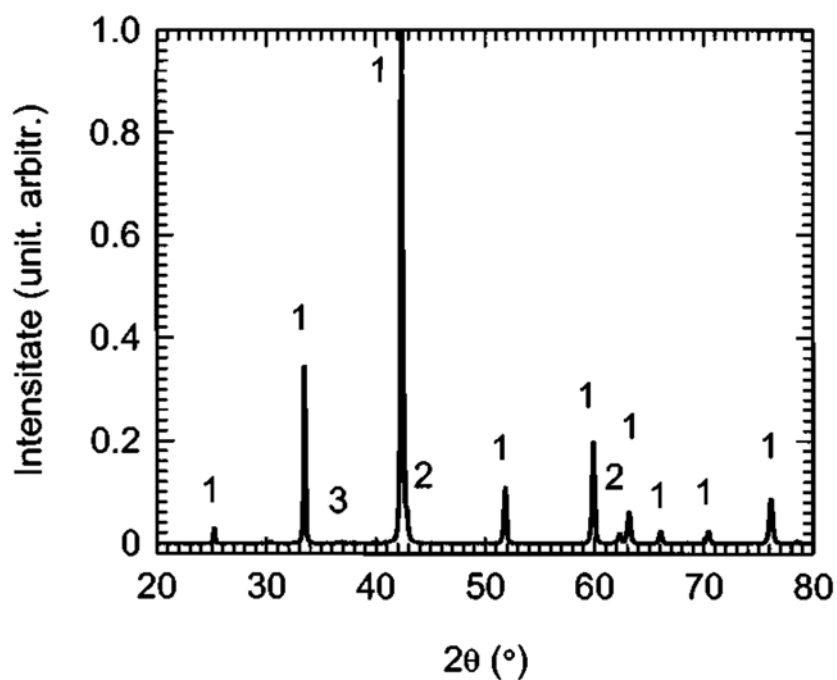
1

Utilizarea diborurii de magneziu ca agent antimicrobian într-o compoziție de apă de gură care conține clorhexidină în care concentrațiile minime inhibitorii ale amestecului MgB₂:apă de gură cu clorhexidină față de tulpinile bacteriene, sunt cuprinse între 0,00005% g:1,25 mg/ml și 0,00004% g:10 mg/ml, iar cele de eradicare ale biofilmului microbial sunt cuprinse între 0,00000039% g:0,009 mg/ml și 0,0004% g:10 mg/ml.

3

5

7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 414/2023