



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00748

(22) Data de depozit: 18/11/2020

(41) Data publicării cererii:
29/04/2021 BOPI nr. 4/2021

(71) Solicitant:
• PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.,
STR.MOISE NICOARĂ, NR.38A, BL.C3,
SC.1, ET.9, AP.100, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• PREDOI SILVIU ADRIAN,
STR.ȘTIRBEI VODĂ, NR.152, BL.26B, SC.1,
ET.2, AP.4, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) DASPIS-SUSPENSIE STABILĂ CU PROPRIETĂȚI
ANTIMICROBIENE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs biocompatibil cu utilizare ca agent antimicrobian cu spectru larg. Procedeu, conform invenției, constă în prepararea unei soluții de acid acetic glacial 1% din 99 ml apă dublu distilată și 1 ml acid acetic glacial 99,9% cu masa moleculară de 60,052 g/mol, peste care se adaugă 0,2 g ZnO cu masa moleculară 81,38 g/mol, cu agitarea amestecului timp de 1 h cu 500 rot/min la temperatura camerei, rezultând un produs sub formă de

suspensie concentrată transparentă, care a fost caracterizată ca atare cu rezultate foarte bune privind stabilitatea suspensiei și spectrul larg de activitate antimicrobiană.

Revendicări: 3
Figuri: 4



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. ... a 2020 00748
Data depozit ... 18-11-2020

DASPIS-Suspensie stabila cu proprietati antimicrobiene

Prezentul brevet se refera la realizarea unei solutii biocompatibile cu proprietati antimicrobiene, pentru utilizarea ca agent antimicrobian cu spectru larg. Produsele antimicrobiene sunt produse medicamentoase care omoara sau impiedica cresterea microorganismelor. Microorganismele - numite si microbi – cuprind bacterii, virusi, ciuperci si paraziti. Tratarca multor boli la oameni si animale se bazeaza pe accesul la substante farmaceutice eficiente /1/. In acelasi timp, poluarea cauzata de unele substante farmaceutice reprezinta o problema emergenta /2-4/, cu dovezi bine documentate ale riscurilor pentru mediu si, in special in ceea ce priveste rezistenta la antimicrobiene, pentru sanatatea umana. Reziuurile de produse farmaceutice pot patrunde in mediu in timpul fabricarii, utilizarii si eliminarii acestora. Articolul 8c din Directiva privind substantele prioritare (2008/105/CE /5/), astfel cum a fost modificata prin Directiva 2013/39/UE /6/) prevede obligatia Comisiei Europene de a propune o abordare strategica in ceea ce priveste poluarea apei cu substante farmaceutice. Prin prezenta comunicare, Comisia isi indeplineste aceasta obligatie legala si da curs unui apel la care se face referire in legislatia in materie de farmacovigilenta de a examina amploarea problemei privind poluarea apei si a solurilor cu reziduuri farmaceutice /7/. Studiile au aratat ca unele substante farmaceutice au efecte directe asupra animalelor salbatice la concentratiile scazute constatate in apa si in sol sau chiar sub aceste niveluri /8/. Acest lucru are consecinte directe asupra ciclului nutrientilor, si efecte indirecte asupra ecosistemelor care includ specii rare de lilieci si pasari /9/. Deosebit de ingrijoratoare sunt indicatiile conform carora emisiile provenite de la unele instalatii de productie a antimicrobienelor in tarile terte /10/, dintre care unele furnizeaza produse pentru consum inclusiv in Uniunea Europeana, ar putea contribui la dezvoltarea si raspandirea rezistentei la antimicrobiene la nivel mondial.

Este binecunosct faptul ca transmiterea incrucisata a microorganismelor apare prin maini contaminate. Factorii care influenteaza transferul microorganismelor de pe o suprafata pe alta si care afecteaza ratele de contaminare incrucisata sunt: tipul de microorganism, sursa si destinatia suprafetelor, nivelul de hidratare si dimensiunea inocularii.

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



Ținând cont atât de riscurile asupra organismelor vii cât și asupra mediului, prezentul brevet își propune obținerea unui produs cu proprietăți antimicrobiene care este biocompatibil și a cărui utilizare nu provoacă reacții adverse asupra oamenilor și organismelor vii prezente în apă și sol și care nu are un efect poluant asupra mediului înconjurător.

Obiectivul principal a fost de a realiza o suspensie biocompatibilă stabilă cu proprietăți antimicrobiene care să contribuie la protecția împotriva microbilor. Eficiența acestui produs împotriva unor tulpini microbiene cu impact în mediul spitalicesc și în afara lui prin testare *in vitro* prin studii antimicrobiene. Stabilitatea produsului sub formă de suspensie stabilă a fost demonstrată prin studii cu ultrasunete.

Pentru obținerea suspensiei antimicrobiene stabile (**DASPIS**) s-au folosit ingrediente cunoscute pentru proprietățile lor curative încă din antichitate cum sunt apa dublu distilată, acidul acetic glacial, AAG (având formula brută $C_2H_4O_2$ și formula chimică CH_3-COOH), 99.9+% cu masă moleculară egală cu 60.052 g/mol, oxidul de zinc (ZnO) cu masă moleculară 81.38 g/mol. Este cunoscut faptul că acidul acetic este un acid slab care în soluții diluate de până la 6% se folosește în alimentație și este cunoscut sub formă de oțet. Pe de altă parte, oxidul de zinc a fost folosit în medicina tradițională indiană încă din anul 500 înaintea erei noastre ca balsam medicinal pentru tratamentul ranilor deschise sau iritației ochilor.

Pentru obținerea suspensiei antimicrobiene stabile s-a preparat o soluție de AAG 1% (este sub concentrația de 6% folosită în alimentație). În 99 ml de apă dublu distilată s-a adăugat 1 ml de AAG. În soluția de apă și AAG 1% s-au adăugat 0.2 g de ZnO. Amestecul rezultat a fost agitat timp de 1h cu 500 rot/min la temperatura camerei în mediu ambiant. A rezultat o suspensie transparentă stabilă pe care am denumit-o DASPIS. Suspensia denumită DASPIS a fost depozitată în flacoane de plastic, la temperatura camerei în mediu ambiant. Suspensia DASPIS este caracterizată din punct de vedere al stabilității prin metode ultrasonore.

Măsurătorile pe baza de ultrasunete reprezintă cel mai precis mod de evaluare a stabilității întrucât această analiză permite evaluarea stabilității suspensiei concentrate spre deosebire de celelalte metode tradiționale în care suspensia trebuie diluată /1/ cunoscut fiind faptul că în urma diluării se pot pierde informații importante cu privire la stabilitate.

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



Masuratorile cu ultrasunete au fost efectuate pe 100 ml de DASPIS folosind o metoda validata /12-13/. La un interval foarte precis de 5,00 secunde pe osciloscopul digital au fost inregistrate semnalele ultrasonore digitalizate. Pentru o corecta si exacta evaluare a stabilitatii DASPIS, apa dublu distilata a fost folosita ca fluid de referinta, in aceleasi conditii experimentale, intrucat este bine cunoscut faptul ca apa este cel mai stabil fluid. Mai mult, pentru exactitate sunt prezentate studiile de stabilitate folosind metoda ultrasonora la diferite intervale de timp (o saptamana si sase saptamani de la momentul obtinerii).

Informatii complexe privind stabilitatea suspensiei DASPIS au fost relevate in urma studiului amplitudinii spectrale relative in raport cu timpul pentru primul ecou (Figura 1) realizate dupa o saptamana (Figura 1a) si sase saptamani (Figura 1b). Dupa cum se poate observa, amplitudinile spectrale relative in raport cu timpul pentru primul ecou au un comportament liniar. Mai mult, atenuarea calculata pentru fiecare componenta spectrala in raport cu timpul are un comportament liniar (Figura 2a). Observam ca atenuarea calculata pentru fiecare componenta spectrala in raport cu timpul isi pastreaza comportamentul liniar cand proba este masurata dupa sase saptamani (Figura 2b). Comportamentul liniar ar atenuarii evidentiaza o foarte buna stabilitate a suspensiei DASPIS in raport cu fluidul de referinta (apa dublu distilata). Pentru a demonstra stabilitatea suspensiei DASPIS in raport cu fluidul de referinta s-a studiat dependenta de atenuare a frecventei atat pentru suspensia DASPIS cat si pentru fluidul de referinta, in aceleasi conditii experimentale dupa o saptamana (Figura 3a) si sase saptamani (Figura 3b). Dupa cum se poate observa din dependenta de atenuare a frecventei prezentata in Figura 3, suspensia DASPIS are o foarte buna stabilitate in raport cu fluidul de referinta atat dupa o saptamana cat si dupa sase saptamani.

In urma calculelor efectuate pe baza masuratorilor realizate, viteza din fluidul de referinta (apa dublu distilata) a fost $c_0 = 1503.92 \text{ m/s}$, in timp ce viteza din suspensia DASPIS analizata dupa o saptamana a fost $c = 1507.34 \text{ m/s}$ si 1509.70 m/s dupa 6 saptamani, respectiv. Temperatura la care s-a efectuat experimentul a fost de $24.8 \text{ }^\circ\text{C}$. Dupa cum se poate vedea, viteza ultrasunetelor prin suspensia DASPIS este foarte aproape de viteza in apa pura confirmand astfel stabilitatea produsului.

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



Pentru o evaluare completa s-au realizat calcule privind parametrul de stabilitate

$$s = \frac{1}{A_m} \left| \frac{dA}{dt} \right|$$

care este strans legat de panta amplitudinii primului ecou vs. timp si ofera informatii cantitative precise despre stabilitatea suspensiei DASPI. Astfel, in urma calculelor realizate, parametrul de stabilitate calculat la o saptamana dupa preparare a fost egal cu $4.84001 \cdot 10^{-6}$ 1/s. Parametrul de stabilitate calculat dupa sase saptamani a fost egal cu $5.09113 \cdot 10^{-6}$ 1/s. Valoarea obtinuta pentru parametrul de stabilitate pentru suspensia DASPIS certifica o stabilitate foarte buna atat dupa o saptamana cat si dupa sase saptamani. Se observa ca in timp valoarea parametrului ramane aproximativ constanta si foarte apropiata de valoarea apei pure (care este egal cu 0). In concluzie, putem afirma ca suspensia DASPIS are o foarte buna stabilitate in timp raportata la apa pura. Stabilitatea suspensiei DASPIS a fost studiata si demonstrata pentru a putea realizate studii biologice relevante cum ar fi activitatea antimicrobiana. Este cunoscut faptul ca o suspensie stabila implica o distributie uniforma a nanoparticulelor ce intra in componenta ei permitand astfel obtinerea unui rezultat concludent. Pentru suspensia DASPIS studiile privind stabilitatea folosind metoda cu ultrasunete sunt complet noi.

Pentru determinarea activitatii antimicrobiene a suspensiei DASPIS s-au utilizat atat tulpini microbiene de referinta cat si tulpini izolate clinic, apartinand bacteriilor Gram pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 1026, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pyogenes* clinica), Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* clinica, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Acinetobacter baumannii* clinica, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* clinica) si a fungilor (*Candida albicans* ATCC 10231 si *Candida albicans* clinica).

Determinarea proprietatilor antimicrobiene ale suspensiei DASPIS a fost investigata calitativ printr-o metoda difuzimetrica, standardizata pentru controlul activitatii antimicrobiene a antibioticelor de catre de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) /14/. Rezultatele testarii calitative au constat in aparitia unor zone de inhibitie pe mediul de cultura ale caror diametre au fost cuantificate. Experimentele au fost efectuate in triplicat, iar rezultatele testelor au fost exprimate ca medie \pm SD.

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



Rezultatele studiilor calitative ale proprietatilor antimicrobiene ale suspensiei DASPIS sunt prezentate in Figura 4. Asa cum se poate observa din Figura 4, suspensia DASPIS a prezentat activitate antimicrobiana asupra tuturor tulpinilor microbiene testate. Mai mult decat atat, se poate observa ca cea mai pronuntata activitate antimicrobiana a fost observata impotriva tulpinilor de referinta ATCC (American Type Culture Collection) comparativ cu tulpinile clinice. Rezultatele au aratat ca cea mai mare zona de inhibitie cu o valoare de 30 ± 2.5 mm a fost obtinuta pentru tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 1026. Rezultate similare ale diametrului zonelor de inhibitie au fost obtinute pentru tulpinile *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 si *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Valorile diametrelor obtinute pentru zonele de inhibitie sunt prezentate in Tabelul 1.

Studiile calitative au pus in evidenta faptul ca suspensia DASPIS are un spectru larg de activitate antimicrobiana si ca poate fi utilizata cu succes atat impotriva tulpinilor microbiene de referinta cat si a tulpinilor clinice izolate de la pacienti care de obicei prezinta o rezistenta crescuta la substante antimicrobiene uzuale.

Tulpinile pentru care s-au obtinut diametre ale zonelor de inhibitie cu valori mai mari de 25 mm sunt marcate in Figura 4 printr-un oval. Cu cat este mai mare zona de inhibitie obtinuta cu atat suspensia are o eficienta antimicrobiana mai ridicata.

Rezultatele studiilor antimicrobiene au aratat ca suspensia DASPIS prezinta o activitate antimicrobiana semnificativa pe o gama larga de tulpini microbiene Gram pozitive, Gram negative si fungi si ca ar putea fi folosita cu succes ca si agent antimicrobiana atat in industria sanitara cat si pentru diverse aplicatii in domeniile biomedicale.

Mai mult decat atat, stabilitatea suspensiei DASPIS a fost evidentiata prin masuratori care au aratat ca suspensia a avut un comportament similar cu cel al apei dublu distilate considerate ca un fluid de referinta.

In prezent, ca urmare a aparitiei infectiilor microbiene care afecteaza sanatatea publica, dezvoltarea de agenti antimicrobieni biocompatibili care ar putea fi utilizati ca o alternativa la cei conventionali este de mare interes. Rezultatele studiilor efectuate asupra suspensiei DASPIS au pus in evidenta faptul ca suspensia este stabila in timp si ca prezinta proprietati antimicrobiene pe o gama larga de tulpini microbiene de referinta cat si clinice.

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



Proprietatile antimicrobiene ale suspensiei DASPIS au fost studiate calitativ utilizand atat tulpini microbiene de referinta cat si izolate clinic, apartinand bacteriilor Gram pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 1026, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pyogenes* clinica), Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* clinica, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Acinetobacter baumannii* clinica, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* clinica) si a fungilor (*Candida albicans* ATCC 10231 si *Candida albicans* clinica). Rezultatele studiilor calitative ale proprietatilor antimicrobiene ale solutiei DASPIS au evidentiat faptul ca solutia a inhibat dezvoltarea tuturor celulelor microbiene testate. Mai mult decat atat, studiile au aratat ca cea mai pronuntata activitate antimicrobiana a fost observata impotriva tulpinilor de referinta ATCC (American Type Culture Collection). Rezultatele studiilor antimicrobiene au aratat ca suspensia DASPIS prezinta o activitate antimicrobiana semnificativa pe o gama larga de tulpini microbiene Gram pozitive, Gram negative si fungi si ca ar putea fi folosita cu succes ca si agent antimicrobian atat in industria sanitara cat si pentru diverse aplicatii in domeniile biomedicale.

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



Tabel 1. Diametrul zonelor de inhibitie obtinute pentru solutia DASPIS asupra tulpinilor microbiene *Staphylococcus aureus* ATCC 1026, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* clinica, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Acinetobacter baumannii* clinica, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* clinica, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pyogenes* clinica, *Candida albicans* ATCC 10231 si *Candida albicans* clinica

Tulpina microbiana	Diametru zonei de inhibitie (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 1026	30±2.5
<i>S. aureus</i> MRSA	24±1.2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	29±1.45
<i>P. aeruginosa</i> clinica	28±1.4
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	26±1.3
<i>A. baumannii</i> clinica	22±1.1
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	29±1.45
<i>E. cloacae</i> clinica	24±1.2
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	28±1.4
<i>S. pyogenes</i> clinica	25±1.25
<i>C. ATCC 10231</i>	12±1.2
<i>C. albicans</i> clinica	8±0.8

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



REVENDICARI

1. Obținerea unei suspensii biocompatibile stabile cu proprietati antimicrobiene caracterizate prin aceea ca se combina ingrediente cunoscute pentru proprietatile lor curative inca din antichitate cum sunt apa dublu distilata, acidul acetic glacial si oxidul de zinc.
2. Obținerea suspensiei antimicrobiene stabile caracterizate prin aceea ca s-a preparat o solutie de acid acetic glacial (AAC) de concentratie 1% in care s-au adaugat 0.2 g de oxid de zinc (ZnO) iar amestecul rezultat a fost agitat timp de 1h la 500 rot/min la temperatura camerei in mediu ambiant si avand ca rezultat o solutie transparenta denumita in continuare DASPIS.
3. Analiza stabilitatii suspensiei DASPIS caracterizate prin aceea ca se studiaza stabilitatea printr-o metoda de analiza nondistructiva pe baza de masuratori cu ultrasunete.

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi



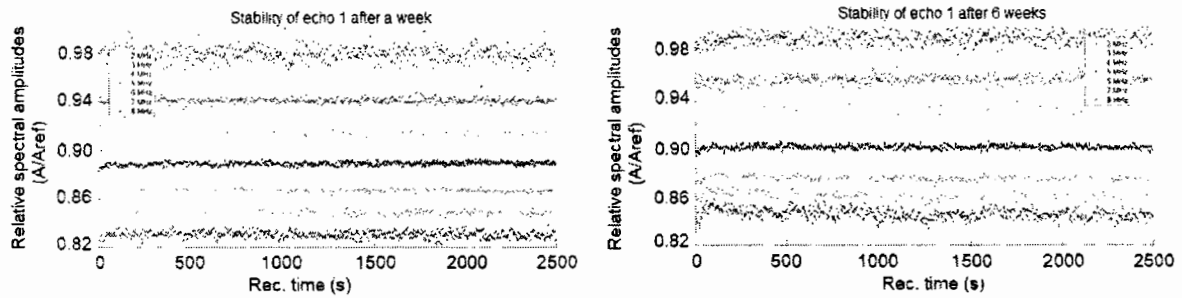


Figura 1. Amplitudinii spectrale relative in raport cu timpul pentru primul ecou realizate dupa o saptamana (a) si sase saptamani(b).

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi

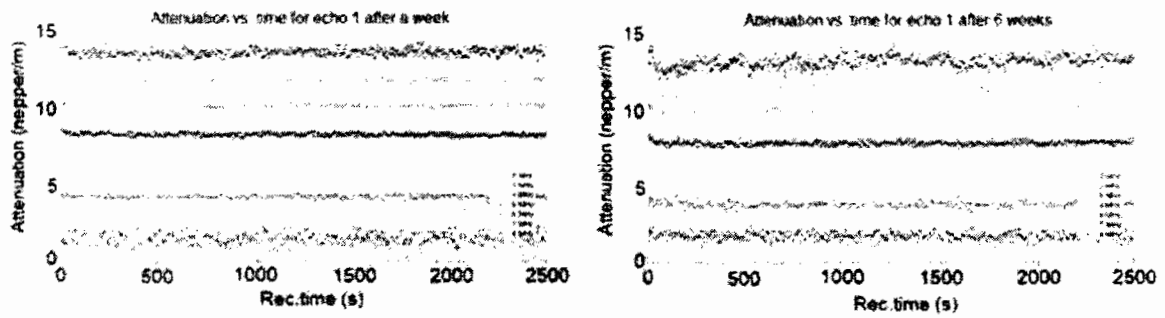


Figura 2. Atenuarea functie de timp pentru componentele spectrale ale ecoului 1 dupa o saptamana (a) si sase saptamani (b).

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi

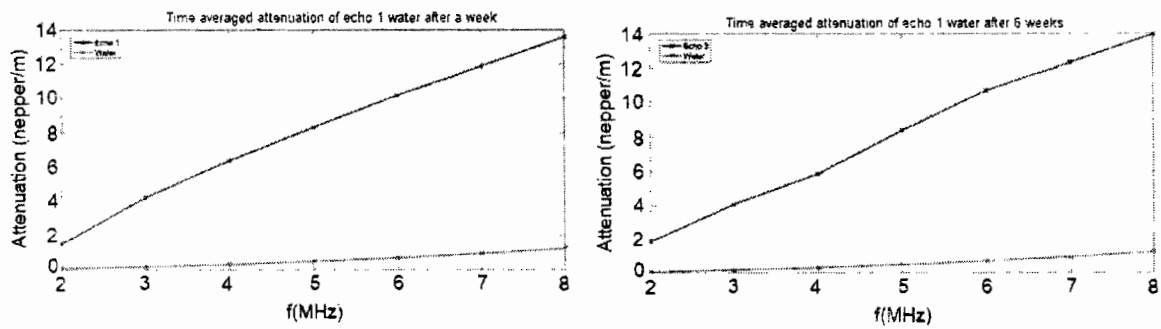


Figura 3. Atenuare fata de frecventa pentru primul eco transmis pentru fluidul de referinta (rosu) si suspensia DASPIS (albastru) dupa o saptamana (a) si sase saptamani (b).

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi

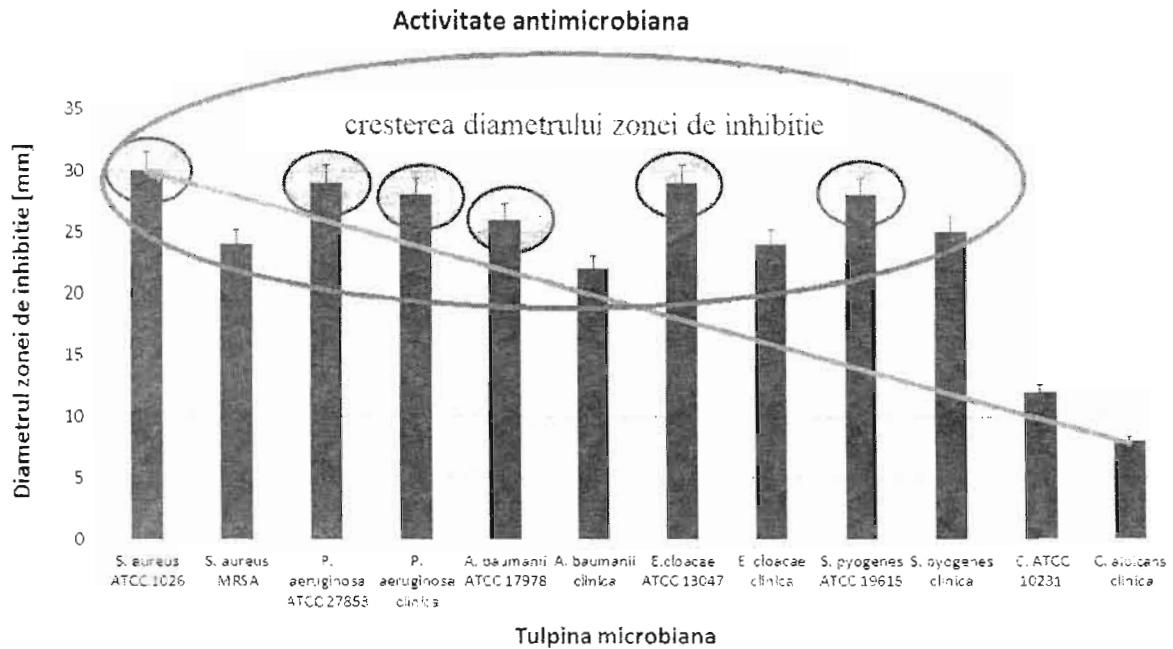


Figura 4. Diametrele zonelor de inhibiție ale soluției DASPIS împotriva tulpinilor microbiene *Staphylococcus aureus* ATCC 1026, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* clinica, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Acinetobacter baumannii* clinica, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* clinica, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pyogenes* clinica, *Candida albicans* ATCC 10231 și *Candida albicans* clinica

Administrator **PREMEDIO TECHNOLOGIES S.R.L.**,
Silviu Adrian Predoi