

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 006**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28 (2006.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A61K 36/68 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61K 36/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2015** **E 15188006 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3150213**

54 Título: **Composición médica teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2020

73 Titular/es:

**BRAERG - GROUPO BRASILEIRO DE
PESQUISAS ESPECIALIZADAS LTDA (100.0%)
190 Fernando Silva Street, Room 801 to 806,
Rooms 901, 903 and 905, Astro Garden
18017-158 Sorocaba - SP, BR**

72 Inventor/es:

**MARQUES, DOUGLAS SPALATO y
MARQUES, MARCOS SPALATO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 749 006 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

Composición médica teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas

5 Esta invención se refiere a una composición médica teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas. En concreto, la invención se refiere a una composición médica que inhibe el crecimiento de patógenos por medio de una asociación sinérgica de extractos vegetales de *Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L., y *Plantago major* L., y, opcionalmente, *Casearia sylvestris* SW, dicha formulación siendo prevista para aplicación tópica o en la forma de una biopelícula o forma de dosis sólida sin el uso de conservantes.

10 Fondo de la invención

15 El saneamiento de las heridas es un fenómeno complejo y ordenado que implica varios procesos, incluyendo la regeneración, la migración y la proliferación de células de tejidos conectivos y parenquimatosos, la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (ECM), la remodelación del tejido conectivo, los componentes parenquimatosos, la colagenización y la adquisición de fuerza de la herida (KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. Wound Healing. Esthetic Dermatology - Revised and Broadened – 2ª edición. EDITORA ATHENEU. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2009, p. 11-16).

20 La eficiencia de la reparación de los tejidos facilita la re-epitelialización de la epidermis y la sustitución de la dermis por una nueva matriz extracelular. Por lo tanto, la pérdida de partes que pueden cambiar arquitectura del tejido lleva a una respuesta fibroproliferativa, resultando en una cicatriz fibrosa palpable y visible. Cuando un trauma es persistente o recurrente, la inflamación se vuelve perpetua y la reparación del tejido es retrasada y, como resultado, el saneamiento de heridas es deficiente o la fibrosis es excesiva. Mediadores solubles, elementos de sangre (matriz extracelular) son involucrados en la reparación del tejido que se divide en fases identificadas como inflamación, proliferación y remodelación (KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. Wound Healing. Esthetic Dermatology - Revised and Broadened – 2ª edición, EDITORA ATHENEU, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2009, p. 11-16.).

30 En muchos casos, el proceso de saneamiento de las heridas se realiza rápida y satisfactoriamente. La velocidad de saneamiento de las heridas depende del tamaño y de la ubicación de una herida, que puede ser incisional o excisional, y una serie de factores locales como factores de crecimiento, isquemia, edema, tensión baja del oxígeno, infección regional (como insuficiencia arterial o venosa, y neuropatía) e infecciones sistémicas (perfusión inadecuada y enfermedad metabólica), estado nutritivo, condiciones preexistentes, el desgaste de la ropa, la exposición a terapia con radiaciones, hábitos de fumar o tomar. Cuando la evolución de una cicatriz no es normal, eso resulta en heridas crónicas y, si dicha evolución se exagera de alguna forma, puede causar una cicatriz hipertrófica o queloide. La degradación de la matriz provisional es tan importante como su formación, cuya remoción inadecuada puede llevar a fibrosis; por lo tanto, varios factores pueden interferir con el proceso de saneamiento de las heridas (KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. Wound Healing. Esthetic Dermatology - Revised and Broadened – 2ª edición, EDITORA ATHENEU, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2009, p. 11-16.).

40 Por lo que se refiere a las quemaduras, pueden tener una variedad de causas como luz solar, exposición a sustancias químicas (ácidos, productos cáusticos, líquidos inflamables), agentes físicos (calor, frío, electricidad, radiación), y también existen quemaduras causadas por determinados tipos de animales. Se sabe que la piel humana puede tolerar temperaturas máximas de 44°C sin ningún daño. Arriba de este nivel se causan diferentes lesiones, el grado de la lesión siendo directamente proporcional a la temperatura de exposición y al tiempo. (ROSSI LA, FERREIRA E, COSTA ECFB, BERGAMASCO 5 EC, CAMARGO C. Burn prevention: perception of patients and their families. Revista Latino-Americana de Enfermagem. 2003; 11 (1): 36-42), y BOLGIANI; SERRA, 2010. Update on local treatment of burns. Revista Brasileira de Queimaduras. 2010;9 (2): 38-10 44).

50 La presencia de quemaduras en la superficie del cuerpo humano causa la pérdida o el perjuicio de la barrera de protección de la piel, que termina interfiriendo con el tejido saludable y el microbiota normal. Por lo tanto, un paciente se vuelve susceptible a infecciones locales o sistémicas (PRUITT B A, MCMANUS at. The changing epidemiology of infection in burn patients, 1992), (TURRINI RNT. Hospital Infection and mortality. USP. 2002; 36 (2): 177-83, 2002) y (HINRICHSEN SL. DIP: Infectious and parasitic diseases. Primera edición. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005).

60 Además a la destrucción de la barrera epitelial, la presencia de proteínas degradadas y de tejido desvitalizado constituye un medio excelente para el desarrollo y la proliferación de microorganismos. Por lo tanto, la obstrucción vascular por daño térmico en los vasos vuelve difícil para los componentes antimicrobianos y celulares del sistema inmunitario llegar hasta el área quemada (PRUITT B A, MCMANUS at. The changing epidemiology of infection in burn patients, 1992).

65 El número y la variedad de preparaciones tópicas para el saneamiento de las heridas es enorme, la mayoría de ellas siendo inefectivas o perjudiciales para el saneamiento de las heridas, ya que son irritantes y estimulan la formación de tejido de granulación exuberante.

Se sabe que se utilizan partes de *Plantago major* L., sin sinergia con otras plantas, en la medicina tradicional por sus actividades biológicas como saneamiento de las heridas y propiedades antiinflamatorias (ANNET BEIRIT SAMUELSEN: "The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L.A. review", Journal Of Ethnopharmacology, Elsevier Ireland Ltd; IE, vol.71, número 1, 17 de marzo de 2000, páginas 1-21).

Se conocen los efectos antibacterianos, antiinflamatorios y de saneamiento de heridas de *Matricariae recutitae* (CARKE R ET AL: "Matricaria (Chamomilla): Pharmacology", Zeitschrift Fur Phytotherapie 1987 DE, vol.8, número 3, 1987, páginas 67-77). X

El uso del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Casearia sylvestris* SW ha mostrado resultados positivos por la actividad microbiológica contra algunos microorganismos (DA SILVA SAULO L ET AL: "Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*", Pharmaceutical Biology, Swets And Zeitlinger, Lisse, NL, vol.46, número 5, 1 de enero de 2008, páginas 347-351).

El pedido de patente EP2875821 revela una solución hidroalcohólica de *Chamomilla recutita* o *Matricaria Chamomilla* que tiene actividades antimicrobianas, vulnerarias y antiinflamatorias para el tratamiento de la psoriasis. Sin embargo, no revela ninguna posibilidad de sinergia con especies de plantas como *Psidium guajava* L. y *Plantago major* L.

El pedido de patente MX2010013360 revela composiciones farmacéuticas para el alivio o la remoción de manchas hipocrómicas en la piel, hiperpigmentación postinflamatoria, manchas causadas por rayos ultravioletas, lentigo solar, pecas, melasmas y cloasmas persistentes, y piel oscurecida por la luz, dichas composiciones comprendiendo entre el 10% y el 50% de extracto natural de *Matricaria recutita*, conservantes (metilparabeno, propilparabeno) y compuestos sintéticos. Sin embargo, no revela una combinación sinérgica de extractos naturales y utiliza compuestos distintos y conservantes sintéticos, ya que se caracteriza como un cosmético destinado solamente a la aplicación en patologías asociadas con melanocito.

El pedido de patente US5997876 revela una composición para el tratamiento de quemaduras, dicha composición comprendiendo extractos de *Chelidonium majus* (15-25 g), *Plantago major* (15-25 g), *Matricaria chamomilla* (15-25 g), *Achillea millefolium* (15-25 g), *Calendula officinalis* (15-25 g), *Hypericum perforatum* (15-25 g), *Eucalyptus globulus* (15-25 g), *Oleum olivarium* (15 -25 g), y *Cera flava* (80-130 g). Dicha composición no tiene conservantes sintéticos y es una pomada para aplicación tópica. Sin embargo, no usa una combinación sinérgica de extractos naturales como se propone en la presente.

El pedido de patente US2009004301 revela una composición para proteger la piel de enfermedades y deshidratación, dicha composición incluyendo *Juglans nigra* (9%), *Artemisia absinthium* (9%), *Curcuma longa* (7%), *Allium sativum* o propolis (10%), *Glycyrrhiza glabra* (3%), *Hypericum perforatum* (3%), *Matricaria recutita* (2%), niacina (1%), *Aloe vera* (54%) y conservantes sintéticos (2%). La concentración de la mayoría de los extractos usados puede variar entre el 0,5% y el 90%. Sin embargo, revela extractos naturales de plantas diferentes con respecto a los que se proponen en la presente, además de utilizar compuestos y conservantes sintéticos (probablemente, metilparabeno y propilparabeno) y niacina (vitamina B3).

El pedido de patente WO03033007 revela una composición tópica que tiene efectos antiinflamatorios y de saneamiento de heridas, que también puede aplicarse a excoiaciones y úlceras de la piel, dicha composición incluyendo extractos de *Matricaria recutita*, *Althaea officinalis*, *Malva sylvestris*, *Tillia platyphyllos* y *Achillea millefolium*.

El pedido de patente RO126747 revela una composición de una crema alivante de la piel y de saneamiento de heridas comprendiendo *Achillea millefolium* (1% -7%), *Matricaria chamomilla* (4%-8%), *Tagetes patula* (2%-4%), *Lavandula angustifolia* (0,1%-0,3%), *Calendula officinalis* (3%-12%), aceite de oliva (10%), alantoína (0,1%-0,8%), colágeno (0,1%-0,5%), quitosano (0,1%-0,2%), lanolina (0,1%-0,15%), nipagin (0,1%-0,5%), nipasol (0,1%-0,5%), trietanolamina (0,1%-0,5%), y agua destilada (en cantidad suficiente 100%).

El pedido de patente JP2003335623 revela una composición para tratar el envejecimiento de la piel y las inflamaciones de la piel y sus anexos, dicha composición comprendiendo extractos de plantas de la familia Salicaceae y uno o varios tipos de antioxidantes como carotenoides, flavonoides, taninos, ácido gálico y sus sales y esteres, tocoferol y sus derivados, superóxido dismutasa, tioredoxina, tioredoxina reductasa, butil hidroxitolueno, y butil hidroxianisol.

El estado anterior del arte revela muchas composiciones médicas para estimular el saneamiento de las heridas y tratar quemaduras usando como base un extracto de plantas, conservantes y compuestos sintéticos. Sin embargo, el uso exclusivo de materias primas activas vegetales tiene un efecto sinérgico, ya que tienen una gama más amplia de actividad, cuando distintas sustancias producen efectos al mismo tiempo, mientras que los compuestos sintéticos actúan específicamente en un sitio activo.

Teniendo en cuenta que las medicinas de hierbas se utilizan para fines profilácticos, curativos, paliativos o diagnósticos, en 1978 la Organización Mundial de la Salud ha empezado a considerar las plantas medicinales como herramientas importantes en la cura farmacéutica. Según las investigaciones, aproximadamente el 80% de la población mundial depende de prácticas tradicionales en términos de cura primaria de la salud y el 85% de estas personas usa plantas y preparaciones medicinales a base de plantas, y el 67% de las especies de plantas medicinales en el mundo llega de países en desarrollo (ALONSO, Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS, 1998. 1039 p.). Por lo tanto, esta invención suministra una composición medicinal que tiene actividad antiinflamatoria y de saneamiento de heridas que inhibe el crecimiento de patógenos por medio de la asociación sinérgica de dichos extractos de plantas como *Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L. y *Plantago major* L, y, opcionalmente, *Casearia sylvestris* SW, dichas plantas abundando en la flora brasileña y siendo fácilmente adaptables.

Resumen de la invención

En un aspecto, la invención suministra una composición medicinal que tiene actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas que inhibe el crecimiento de patógenos por medio de una asociación sinérgica de extractos de plantas de *Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L. y *Plantago major* L, y, opcionalmente, *Casearia sylvestris* SW,

En otro aspecto, la invención suministra una composición medicinal que tiene actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas para la aplicación tópica en la forma de biopelícula o en formas de dosis sólidas y semi-sólidas.

En todavía otro aspecto, la invención suministra una composición medicinal que tiene actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas que puede utilizar o no conservantes y otros compuestos sintéticos.

Breve explicación de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados del crecimiento microbiano en el medio inoculado con las muestras respectivas después de 24 horas, donde (A) es un control de *Staphylococcus aureus*, (B), el control de esterilización del caldo, (C) - Triclosan ® 0,1%, control de la actividad antimicrobiana, (D) ensayo de caramelos con extractos y (E) ensayo de caramelos sin extractos.

La figura 2 muestra una foto tomada en un contador de colonia del crecimiento bacteriano comparativo de 1mL de muestras en caramelos, demostrando en correspondencia del soporte (A) la alícuota procedente de caramelos con extractos de plantas tomada después de 24 horas de crecimiento y, en correspondencia del soporte (B) - la alícuota tomada desde caramelos sin extractos de plantas después de 24 horas de crecimiento.

La figura 3 muestra una foto tomada en un contador de colonias del crecimiento bacteriano de 1mL de la muestra de caramelos sin extractos de plantas, demostrando en correspondencia del soporte la alícuota tomada después de un ensayo de 24 horas.

La figura 4 muestra una foto tomada en un contador de colonias del crecimiento bacteriano de 1 mL de la muestra de caramelos con extractos de plantas, el soporte siendo una alícuota tomada después de un ensayo de 24 horas.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Una composición medicinal que tiene acción antiinflamatoria y de saneamiento de heridas, materia objeto de la presente invención, incluye una asociación sinérgica de extractos secos de planta de *Matricaria recutita* a una concentración entre el 0,1 y el 10%, *Psidium guajava* L. entre el 0,1 y el 10,0% y *Plantago major* L. entre el 0,1 y el 10,0%.

Opcionalmente, se asocia con la formulación que comprende entre el 0,1 y el 20,0% de extracto seco de *Casearia sylvestris* SW.

Casearia sylvestris SW desde la familia Saliceaceae, descrita en Farmacopeia brasileña 1929, es una especie vegetal de las regiones tropicales y subtropicales de las Américas y es muy común en la mayoría de los estados brasileños. Se encuentra en todos los tipos de formaciones forestales y por eso demuestra una capacidad excelente de adaptación genética, pudiendo por lo tanto sobrevivir en una variedad de ambientes (ALMEIDA, K. C.; BARBOSA, T. R.; SILVA, R. N. R.; JACQUES, D. S.; FREIRE, R. B.; Cytotoxic effect of the water infusion of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) Revista Brasileira de Farmácia. v. 87, n. 2, p. 60-62, 2006.). Como estas plantas presentan una gran diversidad y se encuentran en distintos lugares, tienen distintos nombres comunes. En Brasil diferentes especies son llamadas Guaçatonga, Porangaba y Chá de Bugre (PIO CORRÊA, M. 1984. Dictionary of useful plants of Brazil and exotic crops. Instituto de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v.3). Se utilizan en la medicina popular gracias a sus propiedades antisépticas, antivirales, antiulcerosas, anticancerígenas y de saneamiento de heridas.

Caesaria sylvestris SW se utiliza principalmente para tratar úlceras, tumores, gastritis, mordeduras de serpientes y también como agente de saneamiento de heridas y antipirético (PIO CORRÊA, M. 1984. Dictionary of useful plants of Brazil and exotic crops. Brasília: Ministerio de agricultura - IBDF, 1975. p. 514-516). Los extractos de sus hojas tienen actividad antiinflamatoria, antiulcerogénica, antineoplásica, de saneamiento de heridas y antifúngica (BASILE, 5 A. C., et al., Pharmacological assessment of *Casearia sylvestris* SW I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the crude leaf extract a. J. Ethnopharmacol; v. 30 n 2 p. 185-197, 1990).

Matricaria recutita se conoce popularmente como manzanilla. Es nativa de Sudáfrica, pero actualmente puede encontrarse prácticamente en todo el mundo. También es una planta medicinal que posee el área más grande de cultivo. Tiene propiedades carminativas (de expulsión de gases), antiinflamatorias y antiespasmódicas. Su actividad antiinflamatoria y antiespasmódica es relativa a los componentes de aceite esencial y sus lactonas, mientras que los efectos antiespasmódicos son relativos a los flavonoides (RAMOS, M. B. M.; VIEIRA, M. C.; HEREDIA Z., N. A.; SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G. Production of capitula of chamomile as a result of plant populations and chicken manure incorporated to the soil. Horticultura Brasileira, 20 Brasília, v.22, p. 566-572, 2004).

Los flavonoides y algunos terpenoides presentes en *Matricaria recutita*, y asimismo bisabolol y camazuleno son compuestos responsables para la actividad antiinflamatoria, antiespasmódica, y de relajación uniforme de los músculos, especialmente en el tramo gastrointestinal (SATORI, 25 L. R.; FERREIRA, M. S.; PERAZZO, F. F.; MANDALHO, L.; CARVALHO, J. C. T., Anti-inflammatory activity of the *Calendula officinalis* L and *Matricaria recutita* L. phytocomplex. Revista brasileira de farmacognosia. v. 13, p. 17-19, 2003). Se ha probado que, cuando se utiliza en la forma de una infusión, tiene actividad antiinflamatoria, antibacteriana, de estimulación del hígado y también actividad antimicótica (PETRONILHO, S. L., Characterization of the sesquiterpenic fraction of chamomile populations. Universidade de Avieiro. 2008). Su actividad contra el *Staphylococcus aureus* ha sido probada científicamente por Silva (SILVA, N. C. C. Comparative study of the antimicrobial activity of extracts and essential oils of medicinal plants and synergism with antimicrobial drugs. 2010. 75f. Tesis (MA en biología general y aplicada) - Instituto de ciencias de la vida, Universidade Estadual Paulista, São Paulo).

Los componentes principales contenidos en *Psidium guajava* L., conocida comúnmente como guayaba, son taninos, flavonoides, aceites esenciales, alcoholes, ácidos sesquiterpenoides y triterpenoides, y asimismo una cantidad regular de ácidos, azúcares y pectinas. Entre otras, tiene actividad antimicrobiana, antimutagénica, hipoglucémica (ILHA S. M.; Migliato K. F.; Velloso J. C. R.; Sacramento L. V. Pietro R. C. L. R.; Isaac V. L. B.; Brunetti L.; Corrêa M. A.; Salgado H. R. N.; Phytochemical Study of Guava (*Psidium guajava* L.) having the antioxidant potential for development of phytocosmetic formulations. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 18, n. 3, 2008).

Se ha informado que las hojas y los tallos de guayaba contienen sustancias que tienen una actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus ssp.*, *Shigella ssp.*, *Salmonella ssp.*, *Bacillus ssp.*, *Clostridium ssp.*, *Pseudomonas ssp.* y *Escherichia coli*. También tiene actividad en géneros distintos de hongos, levaduras (candida), amebas y *Plasmodium ssp.* (ALMEIDA, K. C.; BARBOSA, T. R.; SILVA, R. N. R.; JACQUES, D. S.; FREIRE, R. B.; Cytotoxic effect of the water infusion of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). Revista Brasileira de Farmácia. v. 87, n. 2, p. 60-62, 2006).

El género *Plantago major* L. incluye plantas comúnmente conocidas como "tansagem", "língua-de-vaca", etc. Mucha de las especies de este género tienen varias propiedades terapéuticas y especialmente se usan para el tratamiento de las inflamaciones de la garganta y de la boca (ROCHA, J. F.; ROSA, M. M. T.; FRADE, C. C. M.; DIERSMANN, E. M.; Anatomic and histochemical study of *Plantago major* L. e *plantago australis* Lam leaves. Revista universidade rural, v. 22, n. 1, p. 33-10 41, 2002).

Plantago major es una planta herbácea que crece espontáneamente en las regiones templadas y subtropicales, y por lo tanto es una planta que crece fácilmente en Brasil. También se utiliza comúnmente como una infusión para gargarismos, para el tratamiento de inflamaciones e infecciones en el tramo digestivo. Su acción antiinflamatoria se debe a terpenos que tienen un efecto inhibitorio importante en la ciclooxigenasa (COX-1) y su actividad antibiótica se debe a su glicósido que inhibe el crecimiento bacteriano (FREITAS, A. G.; COSTA, V.; FARIAS, E. T.; LIMA, M. C. A.; SOUSA, I. A.; XIMENES, E. A.; Antistaphylococcal activity of *Plantago major* L. Revista brasileira de farmacognosia, v. 12, supl., p. 64-65, 2002).

En una primera forma de realización, la composición médica que tiene actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas se ha impregnado en una biopelícula de celulosa bacteriana.

Pruebas: producción de biopelícula de celulosa de *Acetobacter xylinum*.

Para aislar el *Acetobacter xylinum* (bacteria aeróbica, gram-negativa y flagelada) se usa un medio de cultivo líquido que contiene uvas maduras sin semillas maceradas, 250 ml de vino tinto, y 250 ml de vinagre de vino. Dicho medio de cultivo se ha elegido gracias a las características del *Acetobacter*, que se desarrolla en medios ácidos y convierte el etanol en ácido acético. Las uvas maduras se utilizan como fuente de carbohidratos, proteínas y nitrógeno; las

semillas de uvas se han retirado ya que son ricas de taninos que pueden precipitar las proteínas e inhibir el crecimiento de microorganismos.

Después de siete días de fermentación, ha sido posible observar un zooglea en la superficie del medio. Un medio de cultivo sólido (TSA) se ha utilizado para obtener frotis y aislar la cepa de *Acetobacter xylinum* que macroscópicamente tiene un aspecto basto con bordes bien definidos, aunque amorfos.

Después del aislamiento, la cepa se ha transferido a un segundo medio de cultivo líquido que contiene 1 L de agua de coco maduro, 100ml de ácido acético y 20 g de glucosa. En el día 4, al medio se han añadido 500 ml de agua de coco maduro.

La película se ha transferido a una placa de Petri estéril que contiene 2 ml de solución de hipoclorito de sodio y agua de osmosis inversa (1:1) durante 30 minutos. A la terminación de este proceso, la biopelícula se ha lavado en agua de osmosis inversa por varias veces hasta que fuera limpia.

La biopelícula se ha cortado en pedazos de 5 cm x 5 cm en un ambiente estéril y con la ayuda de una cuchilla estéril, evitando así cualquier posible contaminación.

Cada biopelícula se ha transferido en las placas de Petri y se ha pesado en una balanza semianalítica. Después del pesaje, se han sumergido durante 48 horas en un contenedor que contiene 1,6 g de extracto base de cada una de las cuatro plantas (*Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L. y *Plantago major* L., y, opcionalmente *Caesaria sylvestris* SW).

Los extractos se han impregnado en las biopelículas que se habían colocado en un horno estéril para secar a 35 °C durante 10 horas.

Después del secado, se han pesado y transferido a placas de Petri. Se ha observado que las películas podían impregnar 10 mg de extractos durante 48 horas, fuera de los cuales 2,5 mg eran procedentes de cada uno de los extractos.

La composición médica que tiene actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas en una forma líquida comprende entre el 0,1% y el 10,0% del extracto liofilizado de *Matricaria recutita*, entre el 0,1% y el 10,0% del extracto liofilizado de *Psidium guajava* L., entre el 0,1% y el 10,0% del extracto liofilizado de *Plantago major* L., entre el 0,01% y el 5,0% de vitamina C para aumentar la síntesis del colágeno; entre el 0,5% y el 3,0% de un agente de humidificación, preferiblemente, glicol de propileno; entre el 0,1% y el 1,0% de un agente antioxidante, preferiblemente, EDTA, y agua 100% en cantidad suficiente.

Opcionalmente la formulación incluye la asociación del extracto liofilizado de *Caesaria sylvestris* SW a una concentración entre el 0,1 y el 20,0%.

Preferiblemente, el PH de la composición médica que tiene actividad antiinflamatoria y de saneamiento de heridas en una forma líquida tiene que estar cerca de 6,0.

En una tercera forma de realización, la composición medicinal que tiene actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas en una forma sólida, notablemente, caramelos y pastillas, incluye entre el 0,1% y el 10,0% de extracto liofilizado de *Matricaria recutita*, entre el 0,1 % y el 10,0% de extracto liofilizado de *Psidium guajava* L., entre el 0,1% y el 10,0% de extracto liofilizado de *Plantago major* L., entre el 60,0% y el 96,0% de un agente endurecedor como un dulcificante, preferiblemente seleccionado entre isomaltitol, maltitol, silitol o sorbitol, aislado o en asociación; un componente saborizante y agua en cantidad suficiente.

Opcionalmente la formulación incluye la asociación del extracto liofilizado de *Caesaria sylvestris* SW, entre el 0,1 y el 20,0%.

Pruebas:

La eficiencia de la composición medicinal que tiene actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas, materia objeto de la presente, se ha evaluado en las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, elegidas ya que son grandes agentes que causan patologías en pacientes internos y pacientes externos (MACIEL, C.C.S., CÂNDIDO, H.L.R.F. Hospital Infection: Main Agents and Drugs Administered. VEREDAS FAVIP - Revista Eletrônica de Ciências- v. 3, n. 1 - janeiro a junho de 2010). Las placas de Petri se han preparado con 15 ml de Agar Müller-Hinton, que es más apto para las pruebas de susceptibilidad con las bacterias.

Las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se han aislado y suspendido en 3 tubos diferentes, cada uno conteniendo 10 ml de solución salina estéril al 0,9% e incubado en un horno para crecimiento microbiano hasta que se alcance una turbidez correspondiente a la turbidez estándar de McFarland 0,5

(equivalente a 1×10^6 UFC/mL). Una suspensión de sulfato de bario se ha utilizado como estándar de turbidez, ya que su valor en la escala de MacFarland es 0,5.

- 5 Sucesivamente, cada una de las 3 placas se ha sembrado con uno de los antedichos microorganismos, distribuyéndolos uniformemente en todas las cinco direcciones, de forma de cubrir toda la superficie. Después del sembrado, las placas se han secado a temperatura ambiente.

Antes de inocular las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se han preparado las soluciones siguientes:

- 10 Solución 1: Extracto liofilizado de *Matricaria recutita* (5%), extracto liofilizado de *Psidium guajava* L. (5%), extracto liofilizado de *Plantago major* L. (5%), extracto liofilizado de *Casearia sylvestris* SW (20%), y etanol 70° GL (65%).

- 15 Solución 2: Extracto liofilizado de *Matricaria recutita* (5%), extracto liofilizado de *Psidium guajava* L. (5%), extracto liofilizado de *Plantago major* L. (5%), extracto liofilizado de *Casearia sylvestris* SW (5%), y etanol 70° GL (80%).

Solución 3: Extracto liofilizado de *Matricaria recutita* (3%), extracto liofilizado de *Psidium guajava* L. (3%), extracto liofilizado de *Plantago major* L. (3%), extracto liofilizado de *Casearia sylvestris* SW (3%), y etanol 70° GL (88%).

Control: Etanol 70° GL (100%)

- 20 Se han sumergido discos antibiograma en cada una de las soluciones en triplicado, produciendo 4 discos para cada solución, que más tarde se han transferido a un horno estéril para secado y evaporación de etanol 70° GL a 35 °C durante 10 horas. Después del secado, se han colocado 4 papeles en cada placa con la ayuda de pinzas estériles, cada una siendo impregnada con una de las diferentes soluciones y el control.

- 25 Después de añadir los papeles impregnados con las antedichas soluciones al antibiograma, las placas se han introducido de arriba a abajo en un horno a 36 °C durante 48 horas.

El mismo experimento se ha realizado tres veces, de forma de producir resultados más confiables, como se muestra en las Tablas 1, 2 y 3.

30

Tabla 1: Diámetro de los halos en la primera ejecución del experimento:

Solución 1:	Solución 2:	Solución 3:	Control:	
<i>Staphylococcus aureus</i>	21 mm	18 mm	18 mm	0 mm
<i>Escherichia coli</i>	18 mm	16 mm	16 mm	0 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20 mm	19 mm	19 mm	0 mm

Tabla 2: Diámetro de los halos en la segunda ejecución del experimento:

Solución 1:	Solución 2:	Solución 3:	Control:	
<i>Staphylococcus aureus</i>	20 mm	18 mm	18 mm	0 mm
<i>Escherichia coli</i>	19 mm	15 mm	16 mm	0 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21 mm	19 mm	19 mm	0 mm

Tabla 3: Diámetro de los halos en la tercera ejecución del experimento:

Solución 1:	Solución 2:	Solución 3:	Control:	
<i>Staphylococcus aureus</i>	21 mm	17 mm	18 mm	0 mm
<i>Escherichia coli</i>	16 mm	16 mm	16 mm	0 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19 mm	19 mm	19 mm	0 mm

- 35 Tabla 4: Promedio de los halos en las tres ejecuciones del experimento:

Solución 1:	Solución 2:	Solución 3:	Control:	
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,6 mm	17,6 mm	18 mm	0 mm
<i>Escherichia coli</i>	18 mm	15,6 mm	16 mm	0 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20 mm	19 mm	19 mm	0 mm

Como se muestra en las tablas situadas arriba, es posible establecer que las combinaciones de los extractos de plantas han mostrado una actividad antimicrobiana fuerte contra los microorganismos probados y que su concentración puede influir en las dimensiones del halo de inhibición generado.

40

El grupo de control puede mostrar que la actividad antimicrobiana fue realmente causada por las soluciones que tienen distintas combinaciones de los extractos de plantas.

- 45 Un segundo estudio se ha realizado para controlar el potencial antimicrobiano de la combinación sinérgica de los extractos de *Casearia sylvestris* SW, *Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L. y *Plantago major* L. contra *Staphylococcus aureus*. Este estudio ha incluido la formulación de un caramelo preparado con los extractos de plantas, adoptando el método de dilución en un medio líquido, donde se han inoculado las alícuotas de muestra y los controles como se especifica a continuación (triplicado):

A) Muestras:

Dilución de caramelo: 50% (m/v) disolución de un caramelo (con extractos) en una solución salina estéril, pesando 10 g del caramelo y disolviéndolo en 10 g de solución salina estéril para este fin.

5 Ensayo: En 3 tubos replicantes que contienen 18 mL de caldo de caseína de soja inoculada con las cepas de *Staphylococcus aureus*, se han añadido 2 mL del caramelo disuelto a 50% m/m (cada 10 mL de caldo inoculado con 10^6 UFC se han expuesto al contacto con 1 g del caramelo).

B) Controles:

Base caramelo: Dilución de la masa de caramelo sin extractos:

10 50% (m/m) disolución de un caramelo (sin añadidura de los extractos) en una solución salina estéril, pesando 10 g de la masa de caramelo y disolviéndola en 10 g de una solución salina estéril para este fin.

2 mL de la dilución base de caramelo al 50% m/m sin los extractos se han añadido a los tubos con 18 mL del medio de cultivo inoculado con *Staphylococcus aureus* (cada 10 mL de caldo inoculado con 10^6 UFC se han sujeto al contacto con 1g del caramelo).

15 Control de la inhibición del crecimiento positivo: se ha utilizado un enjuague bucal comercial estándar diluido en un disolvente inocuo a una concentración conocida, cuya concentración inhibitoria mínima también era conocida. Por lo tanto, se ha preparado una solución salina bajo condiciones asépticas de Triclosan ®, de forma que se ha obtenido una concentración del 0,1% m/v en el medio final inoculado, de forma similar a la del ensayo de muestra. Para este fin se han pesado 0,100 g de Triclosan ® en 10 ml de solución salina, la mezcla siendo calentada en el baño de agua durante 30 minutos a 60° C para la disolución. 2mL de esta solución se han añadido a cada tubo (n=3) que contiene 18 mL del medio inoculado (para obtener el 0,1% en el medio inoculado).

25 Control negativo (control del medio): 2 mL de solución salina estéril se han añadido a 3 tubos que contienen 18 ml del medio de cultivo inoculado con *Staphylococcus aureus*.

Todos los tubos ensayados se han incubado a 36,5°C durante 72 horas. El crecimiento se ha observado tomando alícuotas de 1 mL (12h, 24h, 48h, y 72h), que más tarde se han emplatado con la técnica del sembrado en profundidad en una cantidad entre 15 y 20 ml de caseína de soja agar durante un tiempo entre 12 y 24 horas.

30 Los crecimientos microbianos se han analizado comparativamente para observar un efecto inhibitorio posible en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, considerando la formulación de caramelos con y sin extractos de plantas.

35 Debido a la falta de un protocolo ya establecido a este fin, se ha adoptado un método que permite un mayor contacto de los componentes de la formulación con el microorganismo, un método de dilución en un medio líquido habiendo sido seleccionado para eso. Como la idea era solamente comprobar el potencial de inhibición, se ha establecido una concentración de caramelos del 10% m/v (con y sin extractos de plantas) para el medio de cultivo inoculado con 10^6 UFC/mL, siendo observado el crecimiento tomando alícuotas de 1 mL a 0h, 12h, 24h, y 36h. Como mostrado en la figura 1, la turbidez inferior se presenta en el tubo D (caramelo con extractos) después de 24 horas, demostrando que el caramelo con extractos podía afectar el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, siendo las colonias más pequeñas en dimensiones y siendo menor la cantidad relativa, cuando comparada a las alícuotas tomadas desde los tubos de crecimiento con la masa de caramelo sin extractos, mostrando que la combinación de los extractos de plantas de *Casearia sylvestris* SW, *Matricaria recutita*, *Psidium guajava* L. y *Plantago major* L. tiene la capacidad de interferir sensiblemente con el crecimiento de la cepas de *Staphylococcus aureus*.

45 Prueba de eficiencia de las formulaciones contra el crecimiento bacteriano

Para realizar el antibiograma usando los medicamentos a base de hierbas desarrollados, se han preparado cuatro placas conteniendo el medio de cultivo Müeller Hinton, el medio de cultivo habiéndose autoclavado anteriormente y utilizando placas de Petri estériles para prevenir que cualquier otro microorganismo contamine el experimento.

50 Para confirmar la actividad antimicrobiana de los medicamentos a base de hierbas, se ha elegido la bacteria *Staphylococcus aureus*, ya que es uno de los más antiguos simbiontes bacterianos del hombre presente en muchas infecciones diferentes que afectan el organismo, aunque teniendo diferentes toxinas. El liofilizado de *Staphylococcus aureus* se ha vuelto a suspender en 10 ml de solución salina al 0,85%, 0,01 ml siendo utilizados para sembrar de acuerdo con el método de la placa de distribución adaptado usando el método citado por Hindler et al. (1994).

Antibiograma

En este estudio, para comprobar el potencial antimicrobiano de la formulación de los medicamentos a base de hierbas, se han inoculado las alícuotas de muestra y los controles que se especifican a continuación (por triplicado):

60 • Muestra: Inoculada con 10^2 UFC de *Staphylococcus aureus* y conteniendo 1 mL de la base de caramelo con extractos al 50% (m/m).

• Control: Inoculado con 10^2 UFC de *Staphylococcus aureus* y conteniendo 1 ml de la base caramelo sin los extractos al 50% (m/m).

65

El crecimiento microbiológico del *Staphylococcus aureus* se ha visto mayormente afectado por los medicamentos a base de hierbas que han impedido que las colonias se desarrollen correctamente y las ha hecho reproducir en cantidades más pequeñas, probando la actividad antimicrobiana de los medicamentos a base de hierbas.

5 El método de evaluación MIC se ha realizado en una dilución serial donde inicialmente 9 ml del caldo de Mueller Hinton anteriormente autoclavado se han añadido a 4 tubos estériles; luego 1 ml de una solución a una concentración estándar de 10^5 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* se han añadido al primer tubo que se ha centrifugado durante 10 segundos, 1 ml desde este tubo siendo transferido al segundo y el proceso siendo repetido dos veces, de forma de obtener 4 tubos conteniendo las concentraciones de 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 UFC/ml.

10 Inmediatamente después de la dilución, se han añadido 0,8 g de la mezcla de los extractos liofilizados. Los tubos se han tomado para la incubación a 36°C durante 48 horas y, después de este período de tiempo, se ha inoculado 1 ml en las placas conteniendo el cultivo de Mueller Hinton y se han incubado durante 48 horas para cada uno de los 4 tubos, observando el crecimiento microbiológico a 12h, 24h y 48h.

15 Se han observado la ausencia de turbidez de los caldos y la ausencia de UFC en las placas, demostrando que la combinación de los extractos ha inhibido completamente el crecimiento microbiológico en todas las concentraciones de microorganismos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Composición medicinal teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas comprendiendo entre el 0,1 y el 10,0% del extracto seco de *Matricaria recutita*, entre el 0,1 y el 10,0% del extracto seco de *Psidium guajava* L. y entre el 0,1 y el 10,0% del extracto seco de *Plantago major* L.
2. Composición medicinal teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas según la reivindicación 1, donde adicionalmente comprende entre el 1,0 y el 20,0% del extracto seco de *Casearia sylvestris* SW.
3. Composición medicinal teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicha composición se ha impregnado en una biopelícula de celulosa microbiana.
4. Composición médica teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicha composición es en una forma líquida y comprende entre el 0,1% y el 10,0% del extracto liofilizado de *Matricaria recutita*, entre el 0,1% y el 10,0% del extracto liofilizado de *Psidium guajava* L., entre el 0,1% y el 10,0% del extracto liofilizado de *Plantago major* L., entre el 0,01% y el 5,0% de vitamina C, entre el 0,5% y el 3,0% de un agente de humidificación, y entre el 0,1% y el 1% de un agente antioxidante, y agua en cantidad suficiente.
5. Composición medicinal teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas según la reivindicación 4, donde adicionalmente comprende entre el 1,0 y el 10,0% del extracto liofilizado de *Casearia sylvestris* SW.
6. Composición medicinal teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas según la reivindicación 4, donde el pH se encuentra cerca de 6.0.
7. Composición medicinal teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde dicha composición es en una forma sólida y comprende entre el 0,1% y el 10% del extracto liofilizado de *Matricaria recutita*, entre el 0,1% y el 10% del extracto liofilizado de *Psidium guajava* L., entre el 0,1% y el 10,0% del extracto liofilizado de *Plantago major* L., entre el 60,0% y el 96,0% de un agente de endurecimiento y un dulcificante, y agua en cantidad suficiente.
8. Composición medicinal teniendo actividad antibiótica, antiinflamatoria y de saneamiento de heridas según la reivindicación 7, donde adicionalmente comprende entre el 1,0 y el 10,0% del extracto liofilizado de *Casearia sylvestris* SW.

Por traducción conforme.