

POTENCIAL ANTIMICROBIANO CONSERVANTE DE LA PLANTA BRYOPHYLLUM PINNATUM, PARA EL CUIDADO DE LA SALUD

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención trata sobre el uso de materia prima de origen vegetal como insumo para la obtención de formulaciones farmacéuticas, y con prueba de eficacia a través de estudios no clínicos, útiles para la industria farmacéutica y/o herbaria que producen formulaciones para pacientes humanos o en uso veterinario.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente solicitud se relaciona con nuevos agentes antimicrobianos y citotóxicos obtenidos a partir de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken. En la búsqueda investigativa metodológicamente rigurosa e integrativa respecto a la etnomedicina y etnobotánica, actualmente se efectúa un progreso observacional y experimental sobre la planta *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken a nivel multidimensional e interdisciplinario. Estableciéndose como un elemento de apoyo racional y terapéutico, que lleva al investigador frente a la búsqueda de nuevas herramientas y aportes desde lo científico, para perfeccionar los estudios que se han llevado a cabo a través del tiempo.

El problema que se pretende solucionar nace a partir del área de los cuidados de la salud, dirigiendo su análisis al efecto anticancerígeno, efecto en la conservación natural y potencial antimicrobiano que presenta la planta, enfocando sus beneficios terapéuticos, conservación de productos medicinales y del cuidado de la salud; abriendo rutas alternativas y posibles soluciones al paradigma del uso de agentes químicos en los procesos de conservación.

El estado del arte enseña diferentes formulaciones que comprenden extractos de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken. Es así como la solicitud de patente BR102020004250, titulada “*Formulaciones farmacéuticas que contienen compuestos activos de Kalanchoe lachinata y Bryophyllum pinnatum y su actividad*”

antiinflamatoria”, la cual se incorpora acá en su totalidad a modo de referencia, enseña formulaciones farmacéuticas que contienen ingredientes activos de *kalanchoe laciniata* y *bryophyllum pinnatum* y su actividad antiinflamatoria. La presente invención se ocupa de formulaciones farmacéuticas que contienen principios activos que pueden ser en forma de extractos líquidos, fluidos, secos o fracciones de hojas frescas o secas de *kalanchoe laciniata* y *bryophyllum pinnatum* para su uso en el tratamiento de la inflamación causada por cualquier agente etiológico.

Por otro lado, la solicitud de patente PL429012, titulada “*Uso del bryophyllum pinnatum para eliminar el crecimiento de carcinoma benigno*”, la cual se incorpora acá en su totalidad a modo de referencia, enseña el uso de extractos de *bryophyllum pinnatum* para la eliminación de crecimientos de carcinoma no maligno, caracterizado por el hecho de que el jugo y el puré de plumas deben molerse en una pulpa, que debe untarse o ponerse en algodón y aplicarse al cáncer. Además, los mismos pasos se pueden aplicar a las verrugas cancerosas que se están reduciendo o a otras enfermedades cancerosas.

En vista de lo anterior, aún existe la necesidad en el estado del arte de identificar nuevos compuestos activos en los extractos de *bryophyllum pinnatum* y nuevas aplicaciones para los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1, corresponde a un diagrama de flujo para el proceso de caracterización de los extractos de *bryophyllum pinnatum* de acuerdo con una modalidad de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención enseña un método para comparar el efecto conservante antimicrobiano y citotóxico derivado de *bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, con el

del conservante químico Fenoxietanol en el uso de medicamentos tópicos y productos del cuidado de la salud.

La elaboración de un nuevo conservante a base natural con la planta *Bryophyllum pinnatum*, tiene un impacto contundente que abarca el uso de sustrato natural como agente conservante para los medicamentos tópicos y productos del cuidado en salud, determinando así, una búsqueda rigurosa de alternativas con mayor efecto protector en cuanto a la citotoxicidad y reacciones que se producen por el uso de conservantes químicos dentro de los que se destaca el fenoxietanol; determinando en justa medida la aplicación de conservantes naturales que apoyen no solo el proceso terapéutico del ser humano, sino también que generen un desarrollo ecológico y sostenible en aras de una sociedad cada día con mayor riesgo de enfermedades por exposición a alérgenos y enfermedades de hiper e hiporreactividad inmunológicas. Por eso se compara con un conservante ya usado que es a base del compuesto químico fenoxietanol y se busca la patente en cuanto a la creación de un nuevo conservante ecológico y natural, de una planta costo eficiente en todas sus fases de cultivo.

De acuerdo con la presente invención, el método comprende tres etapas que consisten en la caracterización fitoquímica del extracto de *Bryophyllum pinnatum*, la evaluación de la capacidad antibacteriana y la citotoxicidad en huevos de artemisia franciscana del extracto de *Bryophyllum pinnatum*, y el análisis de los datos estadísticos y su comparación con el conservante químico fenoxietanol.

La primera etapa, de caracterización fitoquímica del extracto de *Bryophyllum pinnatum* comprende los pasos de caracterizar el extracto de jugo de *Bryophyllum*, de plantas provenientes de cultivos biodinámicos en cultivos en Colombia, evaluando inicialmente el contenido de bufadienólidos: bufadiolona A, bersaldegenin-3-acetato, bersaldegenin- 1,3,5-ortoacetato y el bersaldegenin-1-acetato. También los contenidos de terpenoides comparado con el producto comercial regulado en Europa. De acuerdo con los resultados obtenidos en la

caracterización anterior se seleccionará el cultivo con mayor concentración de metabolitos y se procederá a realizar la formulación del extracto de *B. pinnatum* para pasar a la segunda fase. Este extracto será sometido a estudios de estabilidad natural y acelerada, recuento de mesófilos, recuento de mohos y levaduras, determinación de *E.coli*, almacenamiento en cabina.

En la segunda etapa, de caracterización de la capacidad antimicrobiana y citotóxica de un producto preliminar a base del extracto de *bryophyllum pinnatum*, se plantea realizar estudio in vitro controlado y aleatorio, comparando el efecto conservante del *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, con el conservante químico fenoxietanol; tomando cepas de bacterias hongos y levaduras en medio de cultivo específico para cada una de ellas. Evaluando la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad. Inoculando las diferentes muestras tanto del *Bryophyllum Pinnatum* (Lam.) Oken, como del fenoxietanol; con agentes microbianos de cepas establecidas de virus, bacterias y hongos.

La metodología se basa en la prueba de eficacia para la preservación de cosméticos (NF T75-611) referencia vigente en la farmacopea europea. Los microorganismos se cultivarán de 24 a 48 horas a 35 grados Celsius, en triptona de soya para las bacterias (Chemunex, ref AEB122869), cultivo en Sabouraud (ref A3314D) para *Aspergillus niger* y cultivo YM (Difco, ref 268110) para *Candida albicans*, previo a una inoculación en medio de solución salina que contenga 10⁴ ufc de hongos, 10⁵ ufc de levadura o 10⁶ ufc de bacteria. Luego de este proceso de inoculación de estos microorganismos en microplacas pares que contengan uno de ellos el extracto de *Bryophyllum* y el otro el Fenoxietanol, se cubrirán las muestras con película adhesiva transpirable y se incubaran a 28 grados Celsius, para estudiar el crecimiento los días 1, 7, 14 y 21 respectivamente, extrayendo de cada muestra estudio poblacional. Microorganismos incluidos en la evaluación:

- ATCC- 10231: *Candida albicans*
- ATCC- 6538: *Staphylococcus aureus*
- ATCC- 8739: *Escherichia coli*

- ATCC-9027: *Pseudomonas aeruginosa*
- ATCC-16404 *Aspergillus niger*

Para la evaluación de la capacidad citotóxica de los extractos se realizará el bioensayo de *Artemia franciscana*, método descrito por Meyer et al. (1982), usado para la investigación de productos naturales, a fin de encontrar la concentración letal CL50 en µg/ml. La *Artemia franciscana*, es un crustáceo perteneciente a la familia de Anostraca, distribuida y adaptada en agua salada en todo el mundo. Los huevos eclosionan en agua salada artificial a 26°C y oxigenación constante después de 48 h. El bioensayo consiste en la preparación de soluciones salinas de aceites esenciales a concentraciones de determinadas de extracto µg/ml disuelto en DMSO (Dimetil sulfóxido). Se emplea como control negativo una solución salina de DMSO al 0.02% (20µL/100 ml agua salina) y una solución salina pura.

Preparadas las soluciones se sirven en recipientes 6 ml de cada solución por triplicado y se colocaron 10 metanauplios de *Artemia franciscana*. Posterior a 24 h a las mismas condiciones iniciales para la eclosión (temperatura y oxígeno), se realiza el conteo de los metanauplios vivos (con movimiento) y se procede al análisis estadístico.

La presente invención establece las características ventajosas del extracto de *Bryophyllum Pinnatum* (Lam.) Oken para sustituir el fenoxietanol como conservante en diferentes productos. El técnico medio con habilidad en la materia entenderá que es posible incorporar el extracto de *Bryophyllum Pinnatum* (Lam.) Oken en diferentes formulaciones y compuestos como preservativo que sustituye el fenoxietanol.