

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 948**

51 Int. Cl.:

A61K 31/43 (2006.01)
A61K 36/23 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61K 36/54 (2006.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2020** **PCT/EP2020/084631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2021** **WO21110915**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2020** **E 20816246 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** **EP 4069221**

54 Título: **Procedimiento de transformación de un aceite esencial**

30 Prioridad:

04.12.2019 EP 19306569

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.11.2024

73 Titular/es:

PRANARÔM INTERNATIONAL S.A. (25.0%)
Avenue des Artisans 37
7822 Ghislenghien, BE;
UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (25.0%);
UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES (25.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%)

72 Inventor/es:

ZHIRI, ABDESSELAM;
OLIVEIRA RIBEIRO, SOFIA;
STÉVIGNY, CAROLINE;
SOUARD, FLORENCE y
BAUDOUX, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 986 948 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

Procedimiento de transformación de un aceite esencial

5 **Sector técnico**

La presente invención proporciona un procedimiento de transformación de un aceite esencial (AE), la fracción de aceite esencial así obtenida y su utilización como medicamento, en particular, su utilización en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano. La presente invención proporciona, además, combinaciones que comprenden la fracción de aceite esencial obtenida según el procedimiento de la presente invención con un antibiótico así como las utilizaciones de estas combinaciones como medicamento, en particular, su utilización en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

15 **Estado de la técnica anterior**

Según las farmacopeas europea y francesa, un aceite esencial (AE) se define como *"un producto oloroso, generalmente de composición compleja, obtenido a partir de una materia prima vegetal definida botánicamente, ya sea por destilación por arrastre con vapor de agua, ya sea por destilación en seco, ya sea mediante un procedimiento mecánico apropiado sin calentamiento. El AE generalmente se separa de la fase acuosa mediante un procedimiento físico que no produce un cambio significativo en su composición"*.

Esta definición también es utilizada por las normas AFNOR (Asociación Francesa de Normalización) e ISO (Organización Internacional de Normalización), así como por la ANSM (Agencia Nacional para la Seguridad de los Medicamentos y Productos Sanitarios) y organismos internacionales.

La mayoría de los aceites esenciales se obtienen mediante destilación por arrastre con vapor de agua. Este procedimiento es con diferencia el más extendido, porque es adecuado para la mayoría de las plantas y es el método validado por la mayoría de las farmacopeas. El objetivo es eliminar con el vapor de agua los constituyentes más volátiles. El vapor destruye la estructura de las células vegetales, libera las moléculas contenidas y arrastra las moléculas más volátiles, separándolas del sustrato de celulosa. El vapor, cargado con la esencia de la materia prima destilada, se condensa en el refrigerante de un alambique antes de ser recuperado en un recipiente de decantación. Las partes insolubles en el agua de condensación se decantan para obtener el aceite esencial.

El reino vegetal cuenta con varios cientos de miles de especies y 4.000 de ellas producen esencias aromáticas; de las cuales sólo unos cientos en cantidad suficiente para poder extraerlas.

La conservación de los aceites esenciales está legalmente autorizada durante un período de 5 años. Asimismo, las esencias obtenidas por expresión en frío de los cítricos sólo se conservan durante 3 años.

Los aceites esenciales se pueden utilizar por vía interna, externa o aérea. Administrados por vía interna, los aceites esenciales a veces resultan irritantes para las mucosas; generalmente se mezclan con aceite vegetal, miel, miga de pan o un soporte neutro porque no se diluyen en agua. En las farmacias es posible comprar preparados de tipo oleocápsulas (con una base de aceite vegetal y cápsulas gastrorresistentes), así como preparados en forma de cápsulas y supositorios. El aceite vegetal o el aceite esencial pueden penetrar en el organismo a través de la piel (vía externa). En este caso, se mezcla entonces con un aceite vegetal de masaje o con una cera, una pomada, una crema o una leche corporal. Finalmente, también se utiliza la difusión seca o húmeda de aceites esenciales difundidos en el aire.

Un aceite esencial puede contener hasta varios cientos de moléculas diferentes, muchas de las cuales tienen propiedades particulares. Por ejemplo, el aceite esencial de salvia esclarea (*Salvia sclarea*), generalmente contiene 250 moléculas diferentes. Estas moléculas se agrupan en varias "familias bioquímicas": cetonas, ácidos, aldehídos, alcoholes, ésteres, éteres, sesquiterpenos, monoterpenos, óxidos aromáticos, hidrocarburos, fenoles. Este "carné de identidad" química del aceite esencial es el reflejo de sus propiedades y se diferencia en función de su especie o subespecie, su origen geográfico, su órgano productor, la naturaleza del suelo, la altitud, la duración de la insolación y su entorno vegetal. Muchos aceites esenciales poseen diferentes quimiotipos.

La utilización de aceites esenciales con fines terapéuticos se llama aromaterapia. Se trata de un sector de la fitoterapia que está ganando impulso en sector sanitario como terapia complementaria. Los aceites esenciales ya han demostrado, a menudo *in vitro*, efectos antisépticos, antibacterianos, inmunoestimulantes, descongestivos, calmantes, antiespasmódicos, estimulantes e incluso antiinflamatorios.

La acción antibacteriana (propia o combinatoria) de los aceites esenciales representa un interés particularmente buscado en vista de la resistencia a las terapias con antibióticos, un importante problema de

salud pública. Los antibióticos han permitido reducir considerablemente la mortalidad asociada a enfermedades infecciosas durante el siglo XX. La notable eficacia de los antibióticos ha motivado su uso masivo y repetido en la salud humana y animal. Sin embargo, su uso masivo y repetido ha provocado la aparición de cepas bacterianas resistentes. Estas resistencias, al principio ocasionales, se han vuelto masivas y preocupantes. Algunas cepas son multirresistentes, es decir resistentes a varios antibióticos, de la misma familia o de familias diferentes. Este fenómeno, en constante aumento, coloca a los expertos en salud en un callejón sin salida terapéutico: ya no tienen soluciones para combatir la infección.

Por el estado de la técnica se sabe que los AE poseen propiedades antibacterianas. Por ejemplo, el documento DE202007015195U1 divulga que el linalool, un compuesto de aceite esencial de cilantro separado por cromatografía en columna después de la extracción por destilación con vapor a partir de semillas, posee actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (actividad propia) así como propiedades antiinflamatorias.

La asociación de compuestos de aceites esenciales con un antibiótico también parece presentar cierto interés ya que algunos de estos compuestos permitirían sensibilizar cepas bacterianas resistentes al antibiótico. Por ejemplo, el documento WO2006/120494A1 evaluó la sensibilización de *K. pneumoniae* a amoxicilina por carveol. Los resultados revelan que los ratones tratados con carveol solo presentan un porcentaje de supervivencia similar al de los ratones no tratados y a los tratados únicamente con amoxicilina. Por el contrario, la combinación de carveol y amoxicilina protegió a los ratones tratados. Según este documento, el carveol puede derivarse de un aceite esencial o sintetizarse químicamente.

De manera similar, el documento WO2017/209588A2 divulga una composición farmacéutica que comprende 1,8-cineol y amoxicilina. Según este documento, el 1,8-cineol potencia el efecto de la amoxicilina y sensibiliza a cepas bacterianas inicialmente resistentes, *E. coli* y *K. pneumoniae*. El cineol utilizado en el documento WO2017/209588A2 es cineol comercial. Este documento menciona que el cineol se puede extraer de ciertos eucaliptos, romeros, artemisa, ajonjos, laureles, salvia, albahaca y alcanfor.

Desafortunadamente, las composiciones antibacterianas a base de aceites esenciales que existen actualmente, en particular las composiciones antibacterianas de los documentos DE202007015195U1, WO2006/120494A1 y WO2017/209588A2, presentan limitaciones. En particular, sigue siendo necesario aumentar la actividad antimicrobiana de las composiciones a base de aceites esenciales, frente a un número aceptable de cepas bacterianas y fúngicas. Asimismo, también es necesario desarrollar nuevas composiciones a base de aceites esenciales que permitan aumentar aún más el efecto potenciador de agentes antimicrobianos, tales como antibióticos o antifúngicos.

Descripción de la invención

La presente invención permite resolver los inconvenientes del estado de la técnica proporcionando un procedimiento de transformación de un aceite esencial que conduce a la obtención de un aceite esencial transformado, correspondiente a la fracción no evaporada del aceite esencial. El aceite esencial transformado mediante el procedimiento según la presente invención presenta una acción antibacteriana mejorada en comparación con un aceite esencial no transformado, posee una actividad propia y una actividad combinatoria (en asociación con diferentes antibióticos) y posee una acción antibacteriana de amplio espectro.

Para resolver este problema, se proporciona, según la presente invención, un procedimiento de transformación de un aceite esencial, que comprende:

- proporcionar un aceite esencial previamente extraído;
- evaporar una fracción comprendida entre el 20 y el 50 % del aceite esencial; y
- obtener un aceite esencial transformado que comprende la recuperación de la fracción no evaporada del aceite esencial;
- combinar dicha fracción no evaporada con, como mínimo, un antibiótico,

caracterizado por que la evaporación se realiza durante, como mínimo, 2 h, bajo una presión inferior o igual a 500 mbar y a una temperatura comprendida entre 40 y 100 °C, y por que el aceite esencial se extrae previamente de ajowán, manzanilla alemana, limoncillo, palmarosa, lavanda estocada, orégano compacto o canela china.

En una realización preferente de la presente invención, un AE se refiere a un AE tal como se define según las farmacopeas europea y francesa, concretamente definido como *un producto oloroso, generalmente de composición compleja, obtenido a partir de una materia prima vegetal definida botánicamente, ya sea por destilación por arrastre con vapor de agua, ya sea por destilación en seco, ya sea mediante un procedimiento mecánico apropiado sin calentamiento. El AE generalmente se separa de la fase acuosa mediante un procedimiento físico que no produce un cambio significativo en su composición.*

Según una realización particular de la presente invención, el AE es un producto oloroso obtenido a partir de una materia prima vegetal definida botánicamente, ya sea por destilación por arrastre con vapor de agua, ya sea por destilación en seco, ya sea mediante un procedimiento mecánico apropiado sin calentamiento. Preferentemente, el AE según la presente invención se obtiene mediante destilación por arrastre con vapor de agua.

Preferentemente, el AE según la presente invención no se obtiene mediante un método distinto de la destilación o el prensado en frío, por ejemplo, no se obtiene mediante extracción con un disolvente, mediante extracción con fluido supercrítico, mediante doble destilación o mediante destilación y extracción simultáneas.

En el contexto de la presente invención, todas las cantidades definidas en porcentajes (%) se refieren a porcentajes de volumen (% en volumen, % en volumen/volumen, % v/v), a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, quedará claro, por ejemplo, para el experto en la materia que la evaporación del 7 % de AE significa que el 7 % del volumen inicial de AE se evapora, mientras que el 93 % del volumen inicial de AE no se evapora. Siempre según este ejemplo, el AE transformado obtenido mediante el procedimiento según la presente invención corresponde, por lo tanto, a la fracción del AE que no se ha evaporado, es decir, el 93 % del volumen inicial de AE. De manera similar, la evaporación del 90 % del AE significa que el 90 % del volumen inicial de AE se ha evaporado, mientras que el 10 % del volumen inicial de AE no se ha evaporado. Siempre según este ejemplo, el AE transformado obtenido mediante el procedimiento según la presente invención corresponde, por lo tanto, a la fracción del AE que no se ha evaporado, es decir, el 10 % del volumen inicial de AE.

Sorprendentemente, los inventores observaron que el procedimiento según la presente invención permitía obtener un aceite esencial transformado que presentaba una actividad antibacteriana mejorada. Asimismo, el aceite esencial transformado mediante el procedimiento según la presente invención se utiliza en combinación con un antibiótico y es eficaz contra diferentes tipos de bacterias.

En el contexto de la presente invención, la actividad propia se refiere a la actividad antimicrobiana ejercida por el propio AE. La actividad propia puede evaluarse, por ejemplo, simplemente midiendo la CMI (concentración mínima inhibidora), que es la concentración más pequeña suficiente para inhibir, *in vitro*, el crecimiento de una cepa bacteriana, después del tratamiento de diferentes cepas bacterianas con diferentes AE transformados o no, según el procedimiento de la presente invención.

Se ha observado que los AE transformados según el procedimiento de la presente invención presentan una actividad propia mejorada, concretamente una reducción de la CMI, sobre diferentes cepas bacterianas en comparación con un AE no transformado según el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, el AE de ajowán y el AE de lavanda estocada transformados según el procedimiento de la presente invención presentan una actividad, como mínimo, 2 veces superior sobre, como mínimo, 3 cepas bacterianas.

La actividad combinatoria se refiere a la interacción sinérgica observada entre el AE transformado y un agente antimicrobiano (que no forma parte del aceite esencial). La actividad combinada se puede evaluar mediante el método de microdilución. Por ejemplo, mediante un método de microdilución en una placa de 96 pocillos donde los productos solos y/o combinados se diluyen por dos, a partir de una concentración inicial del orden de 1.000 µg/ml. Mediante este método se determina la CMI. Se observa una mejora en la actividad cuando la CMI de la combinación de un antibiótico con el aceite esencial transformado o no transformado es inferior a la del antibiótico solo. Por ejemplo, si la CMI del antibiótico solo es de 4 µg/ml y el valor obtenido en la actividad combinatoria es de 0,5 µg/ml, hay una mejora en la actividad de 8 x la actividad del antibiótico solo. Cuanto mayor es la disminución de la CMI, menor es la concentración necesaria de antibiótico cuando se asocia con el AE. Cuanto más disminuye la CMI, más se potencia la actividad del antibiótico contra la cepa bacteriana. Al disminuir las concentraciones del aceite esencial por debajo de su CMI, es probable que se obtengan valores no tóxicos.

En particular, los inventores observaron una actividad combinatoria mejorada, concretamente una reducción en la CMI observada con la combinación en comparación con la observada con el antibiótico solo cuando las bacterias se tratan con diferentes AE transformados según el procedimiento de la presente invención. A modo de ejemplo, el AE de ajowán (*Trachyspermum ammi*), el AE de manzanilla alemana (*Matricaria recutita*), el AE de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y el AE de lavanda estocada (*Lavandula stoechas*), sensibilizan a 3 cepas bacterianas normalmente resistentes a varios antibióticos, cuando se transforman mediante el procedimiento según la presente invención.

Según la presente invención, la evaporación está comprendida entre el 20 y el 50 %, preferentemente entre el 30 y el 50 %, por ejemplo aproximadamente el 45 % del aceite esencial. En efecto, se observó que la actividad propia y combinatoria mejoraba cada vez más en función del porcentaje de evaporación del AE transformado según el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, en actividad combinatoria con penicilina V, el AE del orégano compacto (*Origanum compactum*) transformado según el procedimiento de la

presente invención, muestra, sobre la cepa de *S. aureus* LMG 15975, una CMI de 0,125 µg/ml para una evaporación de aproximadamente el 16 % y disminuye a una CMI de 0,03 µg/ml para una evaporación de aproximadamente el 27,5 %. En cuanto a su propia actividad, en el caso de un AE de lavanda estocada transformado según la presente invención, las CMI calculadas para la cepa de *S. aureus* LMG 8064 disminuyen entre el AE no transformado y transformado según la presente invención, pero también disminuyen adicionalmente a la mitad cuando la evaporación aumenta del 19 al 24 % y nuevamente a la mitad cuando la evaporación aumenta del 24 al 41,5 %.

El procedimiento según la presente invención comprende las etapas de proporcionar un aceite esencial previamente extraído, evaporar entre el 20 y el 50 % del aceite esencial y obtener un aceite esencial transformado que comprende la recuperación de la fracción no evaporada del aceite esencial. Preferentemente, el procedimiento según la presente invención comprende las etapas de proporcionar un aceite esencial previamente extraído, evaporar entre el 30 y el 50 % del aceite esencial, y obtener un aceite esencial transformado que comprende la recuperación de la fracción no evaporada del aceite esencial. Por ejemplo, el procedimiento según la presente invención comprende las etapas de proporcionar un aceite esencial previamente extraído, evaporar aproximadamente el 45 % del aceite esencial y obtener un aceite esencial transformado que comprende la recuperación de la fracción no evaporada del aceite esencial.

Ventajosamente, la evaporación se realiza durante un período comprendido entre 2 y 360 h, preferentemente comprendido entre 2 y 240 h, preferentemente comprendido entre 3 y 96 h, más preferentemente comprendido entre 18 y 96 h, aún más preferentemente comprendido entre 24 y 96 h, por ejemplo durante un período de aproximadamente 72 h. El porcentaje de evaporación dependerá, en concreto, de la duración de la evaporación y de la volatilidad de cada AE estudiado. Por ejemplo, para un AE escasamente volátil, como el AE de palmarosa (*Cymbopogon martinii* var. *motia*), ya se observa una disminución de la CMI después de 3 h.

En una realización particular de la presente invención, la evaporación se realiza bajo una presión inferior o igual a 300 mbar, preferentemente inferior o igual a 150 mbar, más preferentemente inferior o igual a 100 mbar, incluso más preferentemente comprendida entre 25 y 75 mbar, por ejemplo de aproximadamente 60 mbar.

Preferentemente, la evaporación se realiza a una temperatura comprendida entre 40 y 60 °C, por ejemplo a una temperatura de aproximadamente 40 °C.

Según un modo preferente de la presente invención, el aceite esencial previamente extraído se evapora en presencia de una solución que comprende un disolvente elegido entre los hidrocarburos como cloroformo, diclorometano, n-hexano, ciclohexano o éter de petróleo; éteres como éter dietílico; ésteres como acetato de etilo; cetonas como acetona; alcoholes como metanol, etanol o isopropanol; y sus mezclas. Según este modo particular de la presente invención, la solución que comprende el disolvente ayuda a la evaporación del AE. Se añade antes de la evaporación y se evapora sustancialmente por completo durante la evaporación de una fracción del AE.

Preferentemente, la solución que comprende un disolvente es una mezcla hidroalcohólica, estando presente el alcohol a un nivel de, como mínimo, el 50 %.

Ventajosamente, la evaporación se realiza con agitación, preferentemente con una agitación comprendida entre 20 y 300 revoluciones/minuto, preferentemente entre 200 y 300 revoluciones/minuto.

Según la presente invención, el aceite esencial se extrae previamente de una planta seleccionada del grupo constituido por ajowán (*Trachyspermum ammi*), manzanilla alemana (*Matricaria recutita*), canela china (*Cinnamomum cassia*), lavanda estocada (*Lavandula stoechas*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), orégano compacto (*Origanum compactum*), palmarosa (*Cymbopogon martinii* var. *motia*), y sus mezclas.

Según la presente invención, la manzanilla es manzanilla alemana, la canela es canela china y la lavanda es lavanda estocada.

En una realización preferente de la presente invención, el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada o de orégano compacto, preferentemente el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada. En efecto, los inventores observaron que la acción antibacteriana era particularmente eficaz cuando la planta de la que se extrae el AE y a continuación se transforma según el procedimiento de la presente invención era el orégano compacto o la lavanda estocada, siendo los resultados incluso superiores con la lavanda estocada.

Preferentemente, el aceite esencial se extrae previamente de la lavanda estocada y por que la evaporación se realiza durante un período comprendido entre 24 y 96 h, bajo una presión comprendida entre 25 y 75 mbar y a una temperatura comprendida entre 40 y 60 °C. Los inventores han observado, efectivamente, que la acción antibacteriana mejoraba particularmente cuando el AE se extraía de la lavanda estocada y se transformaba según el procedimiento de la presente invención bajo estos parámetros particulares.

- La fracción de aceite esencial, según la presente invención, corresponde a la fracción no evaporada del aceite esencial obtenida mediante una transformación según el procedimiento de la presente invención. En primer lugar se extrae previamente el AE. Los métodos de extracción de AE pueden ser cualquier método de extracción de AE conocido por el experto en la materia. Preferentemente, los métodos de extracción del AE son aquellos que permiten obtener un AE tal como se define según las farmacopeas europea y francesa, es decir, mediante destilación por arrastre con vapor de agua, mediante destilación en seco o mediante un procedimiento mecánico apropiado sin calentamiento. En particular, el AE se extrae mediante destilación por arrastre con vapor de agua. Una vez extraído el AE, se realiza una evaporación de una fracción comprendida entre el 20 y el 50 % del AE durante, como mínimo, 2 h, bajo una presión inferior o igual a 500 mbar y a una temperatura de entre 40 y 100 °C. El AE esencial así transformado comprende la fracción no evaporada del AE.
- La fracción evaporada del AE corresponde a un porcentaje comprendido entre el 20 y el 50 % del AE y la fracción de AE según la presente invención, es decir, la fracción no evaporada del AE obtenida mediante el procedimiento según la presente invención corresponde a un porcentaje comprendido entre el 50 y el 80 % del AE extraído. Una fracción de AE según la presente invención, es decir la fracción de AE no evaporada que corresponde a un porcentaje comprendido entre el 50 y el 80 % del AE, posee una actividad propia y/o combinatoria mejorada.
- La fracción del AE no evaporada según la presente invención corresponde a un porcentaje comprendido entre el 50 y el 80 %, preferentemente comprendido entre el 50 y el 70 %, más preferentemente de aproximadamente el 55 % del AE. En efecto, se ha observado que la fracción de AE no evaporada según la presente invención tiene una actividad antibacteriana que mejora proporcionalmente con la disminución del porcentaje de la fracción AE no evaporada según la presente invención.
- Según la presente invención, la fracción no evaporada de AE según la presente invención procede de una planta seleccionada del grupo formado por ajowán, manzanilla, canela, lavanda, limoncillo, orégano, palmarosa y sus mezclas.
- Según la presente invención, la manzanilla es manzanilla alemana, la canela es canela china y la lavanda es lavanda estocada.
- En una realización preferente de la presente invención, la fracción no evaporada del AE según la presente invención se obtiene a partir de un aceite esencial previamente extraído de lavanda estocada o de orégano compacto, preferentemente el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada. En efecto, los inventores observaron que la acción antibacteriana era particularmente eficaz cuando la fracción no evaporada del AE según la presente invención se transforma a partir de un AE extraído de orégano compacto o de lavanda estocada, siendo los resultados incluso mejores con la lavanda estocada.
- Preferentemente, la fracción no evaporada del AE según la presente invención se transforma a partir de un aceite esencial que se extrae previamente de la lavanda estocada, comprendiendo la transformación una evaporación durante un período comprendido entre 24 y 96 h, bajo una presión comprendida entre 25 y 75 mbar y a una temperatura comprendida entre 40 y 60 °C. Los inventores han observado, efectivamente, que la acción antibacteriana mejoraba particularmente con dicha fracción no evaporada de AE según la presente invención.
- Otro objeto de la presente invención es también una combinación que comprende una fracción de aceite esencial según la presente invención y un segundo aceite esencial que ha sido transformado o no mediante el procedimiento según la presente invención.
- Otro aspecto de la presente invención es una combinación que comprende una fracción de aceite esencial según la presente invención y, como mínimo, un antibiótico.
- Preferentemente, el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en betalactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, antibióticos de ácido fosfónico, macrólidos, quinolonas, etc., y mezclas de los mismos.
- Se ha observado que la actividad combinatoria mejora, es decir que se observa una reducción de la CMI de la asociación de un antibiótico con la fracción no evaporada de AE según la presente invención, en comparación con la CMI del antibiótico solo.
- Preferentemente, el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada y el antibiótico es una penicilina. El efecto antibacteriano es particularmente eficaz cuando la fracción no evaporada de la presente invención procede de lavanda estocada y se combina con una penicilina.
- La presente invención también se refiere a la utilización de la fracción y combinaciones según la presente invención como medicamento.

En el contexto de la presente invención, la fracción y las combinaciones según la presente invención también pueden utilizarse en cosmética o pueden aplicarse al sector de la medicina humana o veterinaria.

- 5 La presente invención también se refiere a la utilización de la fracción y combinaciones según la presente invención en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

Preferentemente, la bacteria que causa la enfermedad infecciosa se selecciona del grupo constituido por la familia *Staphylococcaceae* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), la familia *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*), la familia *Pseudomonadaceae* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), la familia *Mycobacteriaceae* (por ejemplo, *Mycobacterium bovis*), la familia *Enterococcaceae* (por ejemplo, *Enterococcus faecalis*), la familia *Helicobacteriaceae* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), la familia *Streptococcaceae* (por ejemplo, *Streptococcus mutans*), la familia *Moraxellaceae* (por ejemplo, *Acinetobacter baumannii*), la familia *Clostridiaceae* (por ejemplo, *Clostridium difficile*), la familia *Spirochaetaceae* (por ejemplo, *Borrelia garinii*) y sus mezclas.

Según una realización preferente de la presente invención, el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada y la bacteria es *S. aureus*.

- 20 Estas realizaciones así como otras realizaciones de la presente invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

- 25 La presente invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos que describen realizaciones no limitantes de diferentes aspectos de la presente invención.

1. Procedimiento de transformación de aceites esenciales (AE)

- 30 AE comerciales (Pranarom) de ajowán (AW), de albahaca exótica (BE), de manzanilla alemana (CA), de canela china (CC), de cilantro en hoja (CF), de clavo (GF), de limoncillo (LG), de lavanda estocada (LS), de orégano compacto (OC) y de palmarosa (PM) se transformaron según el procedimiento de la presente invención. Para ello, los AE se prepararon añadiendo 0,5 ml de cloroformo a 200 µl de AE. A continuación, los tubos se colocaron en un evaporador Syncore® (Büchi), lo que permitió la evaporación controlada de 96 muestras durante un período definido. La evaporación de las muestras se realizó a una presión de 60 mbar, una temperatura de 40 °C y con una agitación a 250 revoluciones/minuto.

2. Evolución de la evaporación de AE transformados en función del tiempo

- 40 La evaporación de los AE transformados según el procedimiento de la presente invención como se ha descrito anteriormente, en función del tiempo de evaporación, se midió y analizó mediante cromatografía de gases. El porcentaje de evaporación de las muestras se midió después de una evaporación de 3 h (T1), 18 h (T2), 24 h (T3), 48 h (T4) y 72 h (T5). Los resultados, expresados como porcentajes de evaporación, se recogen en las tablas 1 (para los AE menos volátiles) y 2 (para los AE más volátiles).

45

Tabla 1:

	T1	T2	T3	T4	T5
CA	1,4	3,3	4,6	5,4	7,6
CC	1,4	2,8	3,4	4,3	5,1
GF	0,7	1,3	1,8	2,8	3,3
LG	0,8	4,9	6,1	9,6	10,9
PM	0,8	1,8	2,1	3,2	3,5

Leyenda: los resultados se expresan como porcentajes de evaporación

Tabla 2:

	T1	T2	T3	T4	T5
AW	8,0	23,0	23,8	48,3	52,4
BE	2,4	6,2	7,6	13,6	18,4
CF	5,4	9,9	12,8	18,3	22,9
LS	7,1	18,7	23,9	41,5	51,3
OC	6,5	15,3	15,8	24,4	27,4

Leyenda: los resultados se expresan como porcentajes de evaporación

3. Actividades propia y combinatoria de fracciones no evaporadas de AE transformados según el procedimiento de la presente invención

La actividad propia de AE transformados según el procedimiento de la presente invención (AE-T) con una evaporación de 3 h (T1), 18 h (T2), 24 h (T3), 48 h (T4) y 72 h (T5) se comparó con la actividad propia del correspondiente AE comercial no transformado según el procedimiento de la presente invención (AE-C). Los porcentajes de evaporación de cada AE puesto a prueba en función del tiempo de evaporación se presentan en las tablas 1 y 2 anteriores.

Para ello, las soluciones madre de AE (AE-C y AE-T) se diluyeron previamente en DMSO, a razón de 10 µl de AE en 300 µl de DMSO. Se agitaron y almacenaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz, en tubos de vidrio esterilizados en autoclave con tapón de rosca. La actividad propia de los AE se midió mediante el método de microdilución en una placa de 96 pocillos, para obtener la CMI, el valor al cual una solución inhibe el crecimiento bacteriano. Las cepas bacterianas tratadas son *S. aureus* LMG 15975 (estafilococo dorado resistente a meticilina, aquí denominado MRSA +), *E. coli* LMG 8223, *E. coli* LMG 15862, *P. aeruginosa* LMG 6395, *S. aureus* LMG 8064, *S. aureus* LMG 16217 (estafilococo dorado resistente a meticilina, aquí denominado MRSA++), *E. faecalis* LMG 8222, *K. pneumoniae* LMG 20218 y *E. aerogenes* LMG 2094. Los inóculos de las cepas bacterianas se prepararon colocando colonias de 18-24 h de las cepas en suspensión en una solución fisiológica estéril (NaCl al 0,85 %). A continuación, estos inóculos se ajustaron y diluyeron para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/ml. Con respecto a las soluciones a poner a prueba, se añadieron 300 µl de soluciones madre de AE (diluidas en DMSO) a 4,7 ml de medio de cultivo (por ejemplo, *caldo Mueller Hinton*), para obtener una solución de AE de 2 mg/ml que a continuación se diluye en serie por dos en placas de múltiples pocillos. El porcentaje final de DMSO en los pocillos es inferior al 5 %. Después de la inoculación, las placas multipocillos se incubaron durante 18-24 h a 37 °C y se visualizó la presencia de bacterias mediante la adición de metiltetrazolio (MTT).

La actividad combinatoria permite determinar si el AE o el AE-T inhibe el crecimiento bacteriano a una concentración denominada sub-CMI, es decir, a una concentración en la que el AE no posee actividad propia. La concentración sub-CMI de un AE es igual a, como mínimo, dos CMI (diluciones seriadas por dos) por debajo de la cual el AE está activo (actividad propia). Por ejemplo, si la CMI de un AE dado es de 500 µg/ml, la sub-CMI puesta a prueba será de, como mínimo, 125 µg/ml. Los valores de sub-CMI se incluyen en la columna AE_{sub-CMI}.

Se comparó la actividad combinatoria de AE transformados según el procedimiento de la presente invención con una evaporación de 24 h (AE-T3) y 72 h (AE-T5) con la actividad combinatoria del correspondiente AE comercial no transformado según el procedimiento de la presente invención (AE-C). Para determinar la actividad combinatoria se utilizó el mismo método de microdilución utilizado para determinar la actividad antibacteriana propia. Los antibióticos puestos a prueba en asociación con AE transformados o no transformados son amoxicilina (AMOX), penicilina G (PG), penicilina V (PV), cefotaxima (CEFO), gentamicina (GENTA), tetraciclina (TETRA), doxiciclina (DOXY), ampicilina (AMPI) y fosfomicina (FOSFO). Los tipos bacterianos tratados son *S. aureus* LMG 15975 (MRSA+), *S. aureus* 16217 (MRSA++), *E. faecalis* LMG 8222, *E. coli* LMG 15862, *P. aeruginosa* LMG 6395, *K. pneumoniae* LMG 20218 y *E. aerogenes* LMG 2094. La diferencia radica en el hecho de que son los antibióticos los que han sido diluidos en serie por 2. A continuación, se añadieron los AE, a su concentración sub-CMI, y las soluciones se inocularon con las cepas bacterianas mencionadas anteriormente.

Resultados

Los resultados relativos a la actividad propia se expresan en µg/ml e indican la CMI del AE cuando está transformado o no mediante el procedimiento según la presente invención. Los resultados relativos a la actividad combinatoria se expresan también en µg/ml e indican los valores sub-CMI del AE, solo o en combinación con el antibiótico, transformado o no mediante el procedimiento según la presente invención.

Todas las pruebas *in vitro* se realizan, como mínimo, por triplicado en, como mínimo, 3 muestras diferentes de un AE-T.

La tabla 3 recoge los resultados de la actividad propia y combinatoria en asociación con la PV de AE-T según la presente invención de AW, de LS y de OC sobre la cepa *S. aureus* LMG 15975. El antibiótico es la penicilina V (PV) cuya CMI sobre esta cepa es de 4 µg/ml.

Tabla 3:

	% de evaporación	Cepa de referencia: <i>Staphylococcus aureus</i> LMG 15975		
		Actividad propia	AE _{sub-CMI} (µg/ml)	Actividad combinatoria
		CMI: PV/AE (µg/ml)		AE _{sub-CMI} + PV (µg/ml)
PV		4		
AW-C	0	500	125	0,5
AW-T3	23,8	500	125	0,125
AW-T5	52,4	250	62,5	0,06
LS-C	0	> 1.000	500	0,06
LS-T3	23,9	1.000	250	0,06
LS-T5	51,3	500	125	0,03
OC-C	0	250	62,5	0,25
OC-T3	15,8	250	62,5	0,125
OC-T5	27,4	250	62,5	0,03

En el caso del ajowán (AW), el 50 % de los componentes menos volátiles están presentes en el AE-T después de 72 h de evaporación. Esta transformación, denominada AW-T5, aumenta ligeramente la actividad propia del ajowán que pasa de una CMI de 500 µg/ml a una CMI de 250 µg/ml. En la actividad combinatoria, el ajowán no transformado (AW-C) aumentó la actividad de la penicilina V al disminuir su CMI, que pasó de 4 µg/ml (PV solo) a 0,5 µg/ml (PV + AW-C a 125 µg/ml). El efecto combinatorio es aún más eficaz con los AE-T de AW. Combinada con los AE-T3 (24 h de evaporación) y T5 (72 h de evaporación), la CMI de la penicilina V disminuye a 0,125 µg/ml y a 0,06 µg/ml, respectivamente, con respecto a la CMI de la penicilina V sola, que es de 4 µg/ml.

En el caso de la lavanda estocada (LS), los porcentajes de evaporación son similares a los del ajowán, es decir que a las 72 h (LS-T5) también se alcanza una evaporación de aproximadamente el 50 % de los compuestos más volátiles. En la actividad propia, la CMI de LS-C que era superior a 1.000 µg/ml disminuye gradualmente hasta alcanzar 500 µg/ml a las 72 h de evaporación (LS-T5). En la actividad combinatoria, el AE-T5 aumenta la actividad de la penicilina V: la CMI de la penicilina V, que por sí sola es activa a 4 µg/ml, disminuye a 0,06 µg/ml cuando se asocia con LS-C y LS-T3 y a 0,03 µg/ml cuando se asocia con el AE-T5.

En el caso del orégano (OC), las transformaciones provocan una evaporación de los compuestos más volátiles de aproximadamente un 16 % a las 24 h (OC-T3) y de aproximadamente un 27 % a las 72 h (OC-T5). La actividad directa de los AE-T de OC se mantiene a 250 µg/ml durante todas las transformaciones (OC-T3 y OC-T5). En la actividad combinatoria con penicilina V, los AE-T resultantes de la transformación disminuyeron significativamente las CMI con respecto a las del orégano comercial (OC-C): la CMI de la penicilina V sola es de 4 µg/ml y disminuye a 0,25 µg/ml cuando se asocia con OC-C. La CMI de la penicilina V disminuye gradualmente a 0,125 µg/ml cuando se asocia con el extracto OC-T3 y alcanza la concentración de 0,03 µg/ml cuando se asocia con OC-T5.

En los tres casos, la asociación de los AE-T5 (AW-T5, LS-T5 y OC-T5) con penicilina V permite descender a intervalos de concentración cercanos a los obtenidos en la cepa MSSA LMG 8064 (*Staphylococcus aureus* sensible a meticilina) cuya CMI de PV es 0,015 µg/ml. Los AE-T según la presente invención tienen, por lo tanto, la capacidad de restablecer la actividad de la penicilina V en una cepa que se ha vuelto resistente.

En conclusión, el procedimiento de transformación según la presente invención permite obtener AE-T a partir de aceites esenciales que tienen una actividad antibacteriana aumentada ya sea en actividad propia cuando el AE-T se utiliza solo y/o en actividad combinatoria cuando el AE-T se combina con un antibiótico. Este último caso es tanto más interesante ya que permitiría reducir las dosis de antibióticos a administrar asociándolos con un AE-T cuya dosis no es activa *per se*.

La tabla 4 recoge los resultados de la actividad combinatoria en asociación con AMOX, PV y PG del AE-T según la presente invención de LS sobre la cepa *S. aureus* LMG 16217. Los antibióticos son amoxicilina cuya CMI en esta cepa es de 64 µg/ml, penicilina G cuya CMI en esta cepa es de 64 µg/ml y penicilina V cuya CMI en esta cepa es de 64 µg/ml.

Tabla 4:

Tabla 4.			
% de evaporación		Cepa de referencia: <i>Staphylococcus aureus</i> LMG 16217	
		AE _{sub-CMI} (µg/ml)	Actividad combinatoria
			AE _{sub-CMI} + AB (µg/ml)
AMOX			
LS-C	0	500	32
LS-T3	23,9	125	4
LS-T5	51,3	125	4
PV			
LS-C	0	500	32
LS-T3	23,9	125	4
LS-T5	51,3	125	4
PG			
LS-C	0	500	32
LS-T3	23,9	125	8
LS-T5	51,3	125	8

La tabla 5 recoge los resultados de la actividad propia de los AE-T según la presente invención de AW, CC, LG, OC y PM sobre la cepa *Escherichia coli* LMG 15862.

5

Tabla 5:

	% evaporación	Cepa de referencia: <i>Escherichia coli</i> LMG 15862	
		Actividad propia	
		CMI: AE (µg/ml)	
AW-C	0	1000	
AW-T2	23	500	
AW-T3	23,8	500	
AW-T4	48,3	250	
CC-C	0	500	
CC-T2	2,8	500	
CC-T3	3,4	250	
CC-T4	4,3	250	
LG-C	0	>1000	
LG-T2	4,9	>1000	
LG-T3	6,1	>1000	
LG-T4	9,6	1000	
OC-C	0	500	
OC-T2	15,3	500	
OC-T3	15,8	250	
OC-T4	24,4	250	
PM-C	0	>1000	
PM-T2	1,8	1000	
PM-T3	2,1	1000	
PM-T4	3,2	1000	

En todos los casos (AW, CC, LG, OC y PM), la actividad propia aumenta cuando los AE están transformados según el procedimiento de la presente invención en comparación con los AE no transformados (AE-C). En efecto, se observa una disminución general de la CMI cuando la cepa *E. coli* LMG 15862 se trata con los diferentes AE-T (AW, CC, LG, OC y PM) transformados según el método de la presente invención.

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de transformación de un aceite esencial que comprende:

- proporcionar un aceite esencial previamente extraído;
- evaporar una fracción comprendida entre el 20 y el 50 % del aceite esencial; y
- obtener un aceite esencial transformado que comprende la recuperación de la fracción no evaporada del aceite esencial;
- combinar dicha fracción no evaporada con, como mínimo, un antibiótico,

caracterizado por que la evaporación se realiza durante, como mínimo, 2 h, bajo una presión inferior o igual a 500 mbar y a una temperatura comprendida entre 40 y 100 °C, y **por que** el aceite esencial se extrae previamente de ajowán, manzanilla alemana, limoncillo, palmarosa, lavanda estocada, orégano compacto o canela china.

2. Procedimiento de transformación, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la evaporación está comprendida entre el 30 y el 50 %, preferentemente es aproximadamente el 45 % del aceite esencial.

3. Procedimiento de transformación, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la evaporación se realiza durante un período comprendido entre 18 y 96 h, incluso más preferentemente comprendido entre 24 y 96 h, todavía más preferentemente durante un período de aproximadamente 72 h.

4. Procedimiento de transformación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la evaporación se realiza bajo una presión inferior o igual a 300 mbar, preferentemente inferior o igual a 150 mbar, más preferentemente inferior o igual a 100 mbar, incluso más preferentemente comprendida entre 25 y 75 mbar, todavía más preferentemente de aproximadamente 60 mbar.

5. Procedimiento de transformación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la evaporación se realiza a una temperatura comprendida entre 40 y 60 °C, más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 40 °C.

6. Procedimiento de transformación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada o de orégano compacto, preferentemente el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada.

7. Procedimiento de transformación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada y **por que** la evaporación se realiza durante un período comprendido entre 24 y 96 h, bajo una presión comprendida entre 25 y 75 mbar y a una temperatura comprendida entre 40 y 60 °C.

8. Combinación susceptible de obtenerse mediante el procedimiento de transformación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicha combinación una fracción de aceite esencial y, como mínimo, un antibiótico.

9. Combinación, según la reivindicación 8, que comprende un segundo aceite esencial que ha sido transformado o no mediante el procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

10. Combinación, según la reivindicación 8, **caracterizada por que** el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada y el antibiótico es una penicilina.

11. Combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para una utilización como medicamento.

12. Combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para una utilización en la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

13. Combinación para la utilización, según la reivindicación 12, **caracterizada por que** el aceite esencial se extrae previamente de lavanda estocada y la bacteria es *S. aureus*.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- DE 202007015195 U1
- WO 2017209588 A2
- WO 2008126494 A1