

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243425 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **434644**

(22) Data zgłoszenia: **2020.07.13**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.01.17 BUP 03/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.08.28 WUP 35/2023**

(51) MKP:

A61K 36/61 (2006.01)

A61K 47/46 (2006.01)

A61K 47/52 (2017.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61P 33/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**PAŃSTWOWA AKADEMIA NAUK
STOSOWANYCH W KROŚNIE, Krosno, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**HENRYK RÓŻAŃSKI, Krosno, PL
HUBERT IWŃSKI, Grodzisk Mazowiecki, PL
ANTONI SZUMNY, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

Magdalena Jezierska-Zięba, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Kompozycja pierwotniakobójcza do leczenia i/lub zapobiegania chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi zawierająca olejek herbaciany oraz sposób jej wytwarzania

PL 243425 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja pierwotniakobójcza do leczenia i/lub zapobiegania chorób wywoływanych przez pierwotniaki u ludzi zawierająca olejek herbaciany oraz sposób jej wytwarzania.

Literatura przedmiotu wskazuje, że niektóre metabolity wtórne roślin, takie jak fitoncydy oraz fitoaleksyny posiadają potencjalne właściwości bójcze i statyczne wobec pierwotniaków, bakterii, wirusów i grzybów.

Fitoncydy (gr. fiton – roślina; cyd – sylaba oznaczająca właściwości bójcze) po raz pierwszy zostały wykryte przez radzieckich badaczy w latach 1928–1930. Największe osiągnięcia nad badaniem fitoncydów mają: G.I. Nilów, B. P. Tokin (1900–1984), A. Fitatow i I. Toropcew. Termin i definicję fitoncyd zostały wprowadzone przez B.P. Tokina. Fitoncydy to substancje wydzielane i wydalane przez rośliny wyższe (*Cormophyta*) o działaniu antybakteryjnym, pierwotniakobójczym i grzybobójczym. Fitoncydy są odpowiednikiem antybiotyków, wytwarzanych przez bakterie, grzyby i porosty (*Tariq, S., S. Wani, W. Rasool, K. Shafi, M. A. Bhat, A. Prabhakar, A. H. Shalla and M. A. Rather (2019). "A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens." Microbial Pathogenesis 134: 103580.*

Pod względem chemicznym są bardzo zróżnicowane. Fitoncydy są w postaci gazowej, krystalicznej i ciekłej. Sporo z nich ulega sublimacji i wrze w niskich temperaturach, rzędu 30°C. Według B.M. Kozo-Polianskiego lotne frakcje fitoncydów są pierwszą linią obrony rośliny, drugą linią obrony są nie-lotne fitoncydy tkankowe. W literaturze istnieje zamieszanie w terminologii związków chemicznych uczestniczących w procesach odporności roślin na choroby. Z zagadnieniem fitoncydów związane jest pojęcie fitoaleksyn, prohibityny, inhibityny i postinhibityny. W 1960 r. Cruickshank i Perrin po raz pierwszy wyizolowali z *Pisum sativum* (grochu) i zidentyfikowali fitoaleksynę – pizatynę (pizatin). J. L. Ingham w 1973 r. opublikował ciekawy podział czynników odporności roślin wyższych na infekcje (*J.L. Ingham J. L., Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectious and post-infectious resistance, "Phytopath. Z. " 1973, 78, s. 314–335):*

Prohibityny to metabolity ograniczające lub całkowicie hamujące rozwój mikroorganizmów. Istnieją stale w tkankach roślinnych w niezmiennym stężeniu, np. berberyna (alkaloid), izoflawony, katechiny.

Inhibityny są metabolitami, których zawartość w komórkach wzrasta po infekcji, np. kwas chlorogenowy, kumaryny.

Postinhibityny są substancjami powstałymi z istniejących, ale nieaktywnych fitoncydowo związków, np. skutek hydrolizy, utlenienia. Należą tutaj glikozydy cyjanogenne (np. prunazylna w czerechach, sambunigrina w bzie czarnym), tulipozydy, glukozynolaty czosnku i cebuli. Koncepcja Inghama definicji fitoaleksyn nie jest do końca słuszna. Dla przykładu kwas benzoowy, alkohol koniferylowy, skopoletyna, resweratrol, safinol zaliczane są do typowych fitoaleksyn. Zgodnie z hipotezą Inghama substancje te powstają *de novo*, po zetknięciu się z patogenem. Tymczasem wiele roślin posiada te związki stale w swoim składzie chemicznym, bez względu na to, czy są zainfekowane, czy też nie, np. *Myroxylon balsamum* (L.) Harm. Prohibityny, inhibityny i postinhibityny są obecne zarówno w roślinach zdrowych jak i zaatakowanych przez mikroorganizmy chorobotwórcze, dzięki czemu możliwe jest wyodrębnienie tych składników z surowców roślinnych i wprowadzenie ich do preparatów dla zwierząt oraz ludzi. Koncepcję fitoaleksyn opracowali w 1941 r. K.O. Müller i H. Börger. Wg niej fitoaleksyną jest związek, który hamuje rozwój patogenu (*Guest, D. I. (2017). Phytoalexins, Natural Plant Protection. Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition). B. Thomas, B. G. Murray and D. J. Murphy. Oxford, Academic Press: 124–128).*

Czynnik hamujący jest odosobnionym związkiem chemicznym, produktem komórki gospodarza. Fitoaleksyna jest związkiem niespecyficznym w swoim toksycznym oddziaływaniu na patogen, jednakże organizmy chorobotwórcze mogą wykazywać zróżnicowaną wrażliwość na ten związek. Do fitoaleksyn należą substancje o różnorodnej budowie chemicznej, np. resweratrol (stylben), sulfotlenek cyklobrasyniny, momilakton A (diterpen), safinol (poliacetylen), skopoletyna (kumaryna), 7-hydroksykalamenen (seskwiterpen). Nie każdy fitoncyd jest jednocześnie fitoaleksyną (nie spełnia reguły Müllera i Börgera), jednakże każda fitoaleksyna jest fitoncydem. Obecnie zwrócono uwagę na fitoaleksyny ze względu na ich silne właściwości przeciwnowotworowe, np. brassynina, resweratrol. Najprostszą fitoaleksyną jest kwas benzoowy, wytwarzany przez wiele roślin w obliczu wtargnięcia patogenów do tkanek. Fitoaleksyny, prohibityny i inhibityny pełnią rolę obronną u roślin przed patogenami, podobnie jak przeciwciała i interferon u ludzi i zwierząt. Gdy odkryto fitoncydy, a potem fitoaleksyny, od razu rozpoczęto prace

zmierzające do ich wyodrębnienia, stabilizacji i zastosowania w lecznictwie. W dużej mierze przeszkodziły temu intensywnie rozwijane badania nad antybiotykami i sulfonamidami. Hodowle bakterii i grzybów wytwarzających antybiotyki oraz synteza sulfonamidów były niewątpliwie prostsze i tańsze oraz bardziej dostępne technologicznie od fitoncydów oraz fitoaleksyn. Z uwagi jednak na coraz większy problem z narastającą opornością bakterii i pierwotniaków na powszechnie używane chemioterapeutyki, obecnie w niektórych krajach (Szwajcaria, Niemcy, USA, Francja) ponownie wrócono do koncepcji wykorzystania fitoncydów w medycynie. Przy okazji poznano nowe właściwości lecznicze tych związków, np. przeciwmiażdżycowe, hipotensyjne, hipoglikemiczne, onkostatyczne i estrogenne. Już w latach 50. i 60. XX wieku w wielu badaniach stwierdzono, że fitoncydy siarkowe działają silniej i szybciej przeciwbakteryjnie na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne niż niektóre znane antybiotyki (np. bacytracyna, neomycyna). Dodatkowo fitoncydy siarkowe i izosiarkocyjanowe działają rozkurczowo, żółciopędnie, żółciotwórczo i hipotensyjnie (obniżają podwyższone ciśnienie krwi). Wzmagają przenikanie składników pokarmowych z jelit do krwi. Hamują rozwój bakterii gnilnych i grzybów chorobotwórczych. Wywierają wpływ pierwotniakobójczy. Pobudzają wydzielanie soków trawiennych, wzmagają apetyt, obniżają stężenie cholesterolu i glukozy we krwi. Ajoeny (olejki czosnkowe) hamują agregację krwinek, zapobiegając zakrzepicy. Lotny fitoncyd kopytnika, omanu, aksamitki, glistnika, czosnku lub nasturcji zabija prątki gruźlicze w ciągu 3 minut, czyli szybciej niż kwas karbolowy (fenol). Fitoncyd stylbenowy resweratrol wywiera wpływ przeciwnowotworowy, zmniejsza ryzyko zawału mięśnia sercowego, poprawia krążenie wieńcowe i hamuje agregację krwinek oraz tworzenie płytek miażdżycowych. Dodatkowo hamuje rozwój bakterii i grzybów oraz obniża podwyższony poziom glukozy we krwi (H. Róžański, J. Kilar, M. Ruda, *Wpływ roślin fitoncydowych na utrzymanie zdrowotności zwierząt jeleniowatych w ekologicznej hodowli fermowej*. LXXV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego. Materiały konferencyjne, Poznań 2011, s. 209; E. Strzelec, R. Niżnikowski, H. Róžański, M. Klockiewicz, K. Głowacz, G. Czub, A. Darkowska, K. Szymański, A. Pokrop, *Effect of use of herbal feed additive on coccidian invasion level and performance traits in goats*, „Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW Animal Science” 2011, nr 49, s. 11–20).

Wraz z rozwojem chemii analitycznej i fitochemii w XIX i w XX wieku odkrywano nowe związki naturalne o działaniu przeciwpasożytniczym, w tym pierwotniakobójczym.

Wprowadzono wówczas do lecznictwa chininę, berberyinę, pelletierynę, alantolakton, askaridol, santoninę i inne, najczęściej w postaci soli z kwasami nieorganicznymi (Skowroński W., *Farmakologia. Nakładem Polskiego Towarzystwa „Bratnia pomoc” Studentów Akademii Medycyny Weterynaryjnej*, Lwów 1932, s. 183–191).

W II połowie XX wieku zaczęto wykorzystywać sulfonamidy w leczeniu chorób pierwotniakowych. Niestety wraz z coraz częstszym stosowaniem leków chemicznych, szczególnie syntetycznych obserwowano narastanie oporności pasożytów na podawane leki. Fitoncydy i fitoaleksyny mogą stanowić pełnowartościową alternatywę dla antybiotyków i sulfonamidów. Będą więc tutaj należeć prohibityny, inhibityny, postinhibityny i właściwe fitoaleksyny, ponadto metabolity wtórne roślin, które wywierają działanie przeciwdrobnoustrojowe, odkażające, antyseptyczne *in vivo* i *in vitro*, w tym również związki nie zaliczane (na obecnym etapie badań) do czynników odporności typu fitoaleksyn. Początkowo fitoncydy określano jako antybiotyki wytwarzane przez rośliny wyższe (B. Czerwiecki, *Lexicon specificorm, FIWNIA Warszawa 1950*, s. 320–323).

Silne fitoncydy wytwarzają m.in. krwiściąg – *Sanguisorba*, piołun – *Artemisia Absinthium L.*, pokrzywa – *Urtica*, burak – *Beta*, cebula – *Allium cepa L.*, kukurydza – *Zea*, czosnek – *Allium sativum L.* lub *Allium ursinum L.*, gorczyca – *Sinapis*, barszcz – *Heracleum*, pieprz turecki – *Capsicum annuum L.*, czeremcha – *Prunus padus L.*, grab – *Carpinus*, topola – *Populus*, dąb – *Quercus*, jaśmin – *Jasminus*, dereń – *Cornus*, cis – *Taxus*, rzodkiew – *Raphanus*, brzoza – *Betula*, chrzan – *Cochlearia armoracia L.*, jałowiec – *Juniperus communis L.* Lotny fitoncyd czosnku zabija prątki gruźlicy w ciągu 3–5 minut, zatem szybciej niż kwas karbolowy. Fitoncydy stanowią potężny czynnik zmieniający skład mikroflory w atmosferze i glebie. Według B.P. Tokina i G.I. Nilowa 1 hektar jałowca wydziela w ciągu doby 3 kg lotnych fitoncydów; ilość ta wystarcza na wyjałowienie obszaru dużego miasta (A. Danysz, *Farmakologia i receptura, Ministerstwo Obrony Narodowej, Warszawa 1955*, s. 41–46). Rozwój badań biologów radzieckich nad fitoncydami datuje się od 1928 r. Najwięcej badań nad fitoncydami przeprowadził Borys Tokin, profesor biologii, autor wydanej w 1942 roku pracy pt. „Baktericydy rastitelnowo proischożdenia (fitoncydy)” oraz opublikowanej w 1948 r. pracy „Fitoncydy”, a także „Lecznicze środki roślinne (fitoncydy)” w 1949 r.

W ostatnich latach poszukiwanie nowych substancji przeciw drobnoustrojowym doprowadziło do znaczącego wzrostu zainteresowania związkami pochodzenia roślinnego. Przeglądowe opracowania dotyczące zastosowania fitoncydów w ostatnich latach zostały przedstawione w pracach: Degtyarik i in., Duka i Ardelean, Ahuja i in. (Degtyarik S. M., Slobodnitskaya, G. V., Grebneva, E. I., Benetskaya, N. A., Macksimyuk, E. V., & Bepalyi, A. V. (2017). *Effect of phytoncides of plants on viability and virulence of etiologic agents of bacterial infections in fish.*

Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук;

Duka, R., & Ardelean, D. (2010). *Phytoncides and phytoalexins-vegetal antibiotics. Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal), 13(3), 19–25; Ahuja, I., R. Kissen and A. M. Bones (2012). "Phytoalexins in defense against pathogens." Trends in Plant Science 17(2): 73–90.*

Zaobserwować można również znaczny wzrost prac przeglądowych i badawczych dotyczących zastosowania olejków eterycznych. Dotyczą one wielokierunkowego ich zastosowania, począwszy od praktyki weterynaryjnej i wykorzystaniu w poprawie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób bakteryjnych i pasożytniczych, przez zabezpieczanie żywności, a skończywszy na wykorzystaniu ich właściwości leczniczych i bakteriobójczych (Aleksic Sabo, V. and P. Knezevic (2019). *"Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis Dehn. plant extracts and essential oils: A review." Industrial Crops and Products 132: 413–429; Vergis, J., G. Palanisamy, R. Agarwal and A. Kumar (2013). "Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review." Critical reviews in food science and nutrition 55; Singh, A., A. K. Dwivedy, V. K. Singh, N. Upadhyay, A. K. Chaudhari, S. Das and N. K. Dubey (2019). "Essential oils based formulations as safe preservatives for stored plant masticatories against fungal and mycotoxin contamination: A review." Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 17: 313–317; Pateiro, M., F. J. Barba, R. Dominguez, A. S. Sant'Ana, A. Mousavi Khaneghah, M. Gavahian, B. Gomez and J. M. Lorenzo (2018). "Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review." Food Research International 113: 156–166; Raut, J. S. and S. M. Karuppaiyl (2014). "A status review on the medicinal properties of essential oils." Industrial Crops and Products 62: 250–264; Nerio, L. S., J. Olivero-Verbel and E. Stashenko (2010). "Repellent activity of essential oils: A review." Bioresource Technology 101(1): 372–378; Deyno, S., A. G. Mtewa, A. Abebe, A. Hymete, E. Makonnen, J. Bazira and P. E. Alele (2019). "Essential oils as topical anti-infective agents: A systematic review and metaanalysis." Complementary Therapies in Medicine 47: 102224).*

W rozporządzeniu (WE) nr 1831/2003 utrzymano kokcydiostatyki i wprowadzono histomonostatyki jako nową kategorię dodatków paszowych, przy jednoczesnym ustanowieniu wycofania istniejących antybiotyków ze stosowania (i wprowadzania do obrotu) jako dodatki paszowe od dnia 1 stycznia 2006 r., biorąc pod uwagę, że stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych jako stymulatorów wzrostu wiąże się z ryzykiem selekcji szczepów bakteryjnych opornych na leki stosowane w leczeniu ludzi lub zwierząt. Ta kwestia była ściśle związana z Narodowym Programem Ochrony Antybiotyków w Polsce na lata 2006–2010, nadzorowany przez Ministerstwo Zdrowia. Zgodnie z wytycznymi Programu, aby chronić skuteczność terapeutyczną antybiotyków, należy również szczególną kontrolą objąć antybiotykoterapię weterynaryjną, której stosowanie powinno być poddane regulacjom analogicznym do wprowadzanych w medycynie. Antybiotyki stosowane w hodowli zwierząt sprzyjają powstawaniu selekcji i rozprzestrzenianiu się oporności wśród drobnoustrojów tam bytujących.

Lekooporne szczepy mogą przemieszczać się drogą łańcucha żywieniowego i zasiedlać przewód pokarmowy człowieka, tworząc rezerwuary potencjalnych patogenów, w tym również genów oporności, np. *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, które następnie mogą być przekazywane czynnikiem etiologicznym zakażeń u ludzi (H. Różański, W. Drymel, *Preparaty ziołowe w profilaktyce zespołu zaburzonego wchłaniania i marskości wątroby u zwierząt. Polskie Drobiarstwo, cz. I 6/2010, s. 44–46; cz. II 7/2010, s. 28–30; cz. III 8/2010, s. 43–44).*

Niektóre oficjalne kokcydiostatyki mają również charakter antybiotyku o działaniu przeciwbakteryjnym, np. lasalocid jest polieterelem jonoforowym o działaniu antykokcydiowym i antibakteryjnym, wyizolowanym z *Streptomyces lasaliensis* w 1951 r. Również monenzyna (antybiotyk jonoforowy) wyodrębniona w 1967 r. z *Streptomyces cinnamonensis* posiada właściwości kokcydiostatyczne oraz antibakteryjne. Maduramycyna wytwarzana przez *Actinomadura rubra*, hamuje dodatkowo rozwój bakterii gram dodatnich. Antybiotyki te, pomimo, że były uzyskiwane z myślą o zastosowaniu w medycynie ludzkiej, nie znalazły w niej zastosowania z uwagi na toksyczność i działania uboczne, przewyższające wartość terapeutyczną. Pomimo ich wiadomej toksyczności i możliwości tworzenia oporności krzyżowej z innymi antybiotykami oraz kumulacji w produktach pochodzenia zwierzęcego w razie niewłaściwego

użycia, EFSA nie zebrała do tej pory dostatecznych dowodów pozwalających na wycofanie ich z produkcji zwierzęcej. Nie mniej jednak dyskusje na ten temat trwają i są co pewien czas podsycane przez protesty rozmaitych organizacji konsumenckich i ekologicznych (Róžański H., Drymel W.: *Adicox jako źródło fitoaleksyn i fitoncydów. Polskie Drobniarstwo. 12/2010, s. 17–20*).

Podstawowym problemem ograniczającym skuteczność antybiotyków, sulfonamidów i antybiotykowych stymulatorów wzrostu jest antybiotyko- i sulfonamidooporność, czyli uodpornienie się drobnoustrojów na statyczne lub bójcze działanie chemioterapeutyków. Nabywanie oporności przez bakterie (również grzyby i pierwotniaki patogenne) powstaje wskutek selekcji lub adaptacji. Uodpornianie się drobnoustrojów może polegać na zmianach ich metabolizmu, w wyniku czego zostaje ominięta „zablokowana” przez chemioterapeutyk droga przemiany, lub na wytwarzaniu enzymów rozkładających leki przeciwdrobnoustrojowe, np. penicyliooporny szczep gronkowca złocistego wytwarza enzym – penicylinazę, rozkładającą penicylinę. Jest to oporność chromosomalna. Oporność na chemioterapeutyki (np. fluorochinolony, antybiotyki, sulfonamidy) może być wywołana zahamowaniem przenikania leku do wnętrza komórki patogenu, np. w przypadku tetracyklin. Oporność na ogólnie stosowane chemioterapeutyki jest również przekazywana między drobnoustrojami na drodze pozachromosomalnej (plazmidy). Antybiotyko- sulfonamido-, czy fluorochinolonooporność jest właściwością drobnoustrojów, przekazywaną następnym pokoleniom, przy czym często jest to tzw. oporność krzyżowa, tzn. patogen oporny na jeden chemioterapeutyk staje się równocześnie oporny na wiele innych, najczęściej o podobnym mechanizmie działania. Oporność krzyżową stwierdza się np. w stosunku do tetracyklin, częściowo do penicylin i cefalosporyn, do antybiotyków makrolidowych (A. Danysz, W. Buczek, *Kompendium farmakologii i farmakoterapii, Urban i Partner, Wrocław-Warszawa 2008*).

W związku z wprowadzeniem i niekontrolowanym stosowaniem powszechnie coraz większego asortymentu i często w sposób nieprawidłowy chemioterapeutyków narasta niebezpieczeństwo związane z zakażeniami grzybiczymi, wirusowymi oraz wywołanymi przez *Actinobacter* czy *Chlamydia*. Drugim niebezpieczeństwem chemioterapii są enzymy inaktywujące leki przeciwdrobnoustrojowe i antyparazytyczne. Poza beta-laktamazą i dehydropeptydazą I wykryto enzymy unieczynnijające aminoglikozydy. Większość antybiotyków stosowanych w lecznictwie wywiera niekorzystny (immunosupresyjny) wpływ na układ odpornościowy. W związku z tym powstała idea zastosowania w chemioterapii zakażeń dodatkowo środków immunostymulujących (A. Danysz, *Kompendium farmakologii i farmakoterapii. Volumed, Wrocław 1994, s. 110*).

Wiele fitoncydów posiada równocześnie działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwpasożytnicze i immunostymulujące, np. laktony seskwiterpenowe Tanacetum, kapsaicyna, piperyna, czy latreozyd z *Lathraea* (H. Róžański, *Dzieje badań i stosowania w medycynie krajowych roślin pasożytniczych z rodziny Scrophulariaceae oraz Cuscutaceae, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań 2004*; W. Roeske, *Zarys fitoterapii. Farmakologia i receptura ziół leczniczych, PZWL Warszawa 1955, s. 76–78*; D. Korniewicz, H. Róžański, *Effectiveness of active substances of plant origin in pigs feeding, „Mag. Wet.”, Supl. Świnie, 2006, 22–24*).

Świadczą o tym ostatnie niepokojące doniesienia o szczególnej zjadliwości niektórych szczepów *E. coli* oraz *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* są odporne na wankomycynę (VRE), „antybiotyk ostatniej szansy”, wytwarzany przez *Amycolatopsis orientalis*. Enterokokowe geny oporności na antybiotyki trafiają do innych bakterii, np. gronkowców i pałeczek okrężnicy. W XX wieku odkryto linezolid – syntetyczny antybiotyk hamujący syntezę białka u bakterii. Jednak wśród wankomycynoopornych szczepów VRE już się pojawiły szczepy odporne na linezolid. Udokumentowano oporność kliniczną na metronidazol pierwotniaków, np. rzęsistka pochwowego, lamblii, ponadto wielu bakterii beztlenowych. In vitro spostrzeżono również narastanie oporności wśród trofozoitów pełzaka czerwonki wskutek stopniowego podwyższania dawek metronidazolu (Brunton L.L., Lazo J., S., Parker K.L., *Farmakologia Goodmana and Gilmana, tom II. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2007, s. 1127–1129*).

Fitoncydy mogą pomóc w rozwiązaniu problemu oporności na chemioterapeutyki nie tylko bakterii, ale również pierwotniaków.

W produkcji zwierzęcej niebezpieczna stała się chemioprophylaktyka. Przy właściwym wskazaniu może być przydatna i wartościowa, jednakże w wielu przypadkach jest bezużyteczna, a nawet niebezpieczna (zakażenie bakteriami i pierwotniakami lekoopornymi, zamaskowanie objawów chorobowych). Nie należy stosować chemioprophylaktyki w okolicznościach zaniedbań zootechnicznych i żywieniowych, bowiem niewątpliwie prowadzi to do pograżania chemioterapii weterynaryjnej i ludzkiej.

Największy problem stwarza wyodrębnianie z surowców roślinnych fitoncydów oraz ich identyfikacja i stabilizacja. Do tej pory wykonano niewiele badań nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi czystych form chemicznych fitoncydów. Właściwości przeciwbakteryjne i fungi statyczne fitoncydów utożsamiane są z całymi frakcjami substancji lub ekstraktami z roślin leczniczych, a nie z konkretnymi związkami (R Niżnikowski, E. Strzelec, H. Róžański, M. Klockiewicz, K. Głowacz, G. Czub, A. Darkowska, K. Szymański, A. Pokrop: *The effect of addition of phytoncides treatment to concentrate on growth performance and dairy traits in goats. IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk, Athens, May 2011*; W. Drymel, H. Róžański, *Wykorzystywanie fitoaleksyn w poprawie zdrowotności zwierząt gospodarskich. The Polish Branch of World's Poultry Science Association. XXII International Poltry Symposium PB WPSA, „Science for poultry practice-poultry practice for science”. Olsztyn 2010, s. 151).*

W Dziale Badań i Rozwoju AdiFeed opracowano szereg preparatów opartych na fitoncydach. Pomimo ich wprowadzenia na rynek cały czas prowadzone są badania naukowe in vitro i in vivo, ponadto testy terenowe na większej populacji zwierząt gospodarskich (drób, zwierzęta futerkowe, trzoda chlewna, przeżuwacze). Technologia produkcji preparatów fitoncydowych jest skomplikowana, bowiem są to związki labilne (nie trwałe) i reaktywne (wchodzą w reakcję, podlegają spontanicznym przemianom). Część z nich jest lipofilna (rozpuszczają się dobrze w rozpuszczalnikach organicznych, np. tłuszczach, alkoholach), inne z kolei są hydrofilowe (dobrze rozpuszczalne w wodzie). Dlatego też wiele preparatów fitoncydowych ma charakter dwufazowy i przybiera postać emulsji.

Fitoncydy należą do różnorodnych związków chemicznych i stąd preparaty z nich mogą być alkaloidowe, polifenolowe, fenolowe, terpenowe, antrachinonowe, irydooidowe, kumarynowe, poliacetylenowe, saponinowe, czy też fenyloalkiloaminowe. Fitoncydy należące do różnych grup chemicznych mogą wzajemnie wzmacniać i uzupełniać swoje działanie przeciwdrobnoustrojowe, albo też działać antagonistycznie i znosić swoją aktywność.

Dodatek różnych metali, np. żelaza, w niskich stężeniach, wzmacnia działanie antybakteryjne i antyparazytyczne fitoncydów. W mechanizmie działania antyseptycznego i antyparazytycznego wykorzystano efekt oligodynamiczny. Zauważył on, że metale mogą hamować rozwój mikroorganizmów i roślin, jeśli są w odpowiednim stężeniu w środowisku. W XIX wieku nie potrafiono wyjaśnić mechanizmu efektu oligodynamicznego. Do takich metali przeciwdrobnoustrojowych, antyseptycznych należą m.in. miedź, żelazo, srebro, mangan, rtęć, bizmut, cyna, cynk (Róžański H. *Środki antyseptyczne i odkażające stosowane w medycynie dawnej i współczesnej. Lek w Polsce, vol. 14 nr 3'04, s. 66–77. Vol 13 (154) nr 10/2003, s. 68–81, vol 13 (155) nr 11/2003, s. 94–110; Penzoldt F.: Podręcznik farmakologii klinicznej dla użytku lekarzy i studentów. Druk Maryi Ziemkiewiczowej, Warszawa 1891, s. 9–42).*

Wiele z nich znalazło trwałe zastosowanie w lecznictwie. Wkrótce zwrócono też uwagę na „czystość” klamek metalowych (np. mosiężnych i stalowych) w szpitalach, które pomimo, że są dotykane przez licznych chorych pacjentów, na swojej powierzchni nie zawierają aktywnych patogennych bakterii, które z kolei występują licznie na przedmiotach drewnianych, podłogach, tworzywach sztucznych, czy pościeli. Tłumaczy się to zjawisko właśnie efektem oligodynamicznym. Również wody, w tym wody zdrojowe zasobne w rozmaite metale są bardzo ubogie w bakterie. Zanim w medycynie zaczęto stosować antybiotyki i sulfonamidy, powszechnie używanymi chemioterapeutykami i antyseptykami były preparaty bizmutu, srebra, rtęci, żelaza, miedzi, złota, platyny, cyny i cynku (Butkiewicz I: *Chirurgia ogólna. PZWL Warszawa 1954; s. 31–45*). W XX wieku nawet łączono antybiotyki (np. bacytracynę z cynkiem) i sulfonamidy (np. sól srebrowa sulfadiazyny) z metalami dla uzyskania efektywniejszego działania bakteriostatycznego (Chruściel T, Gibiński K. (red.): *Leksykon leków. PZWL Warszawa 1991, s. 484–485*). Podwójny mechanizm działania przeciwbakteryjnego soli srebrowej sulfadiazyny utrudnia powstawanie szczepów opornych (Ibidem, s. 485). Podobną korzyść uzyskuje się po połączeniu fitoncydów z metalami (Drymel W., Róžański H.: *Wykorzystywanie fitoaleksyn w poprawie zdrowotności zwierząt gospodarskich. The Polish Branch of World's Poultry Science Association. XXII International Poultry Symposium PB WPSA, „ Science for poultry practice – poultry practice for science. Olsztyn 2010, s. 151; Korniewicz I.), Róžański H., Effectiveness of active substances of plant origin in pigs feeding. Mag. Wet., Supl.-Świnie., 2006, 22–24).*

Jeżeli do wody destylowanej dodać metalicznego srebra, to nabiera ona właściwości bakteriobójczych, mimo, iż stężenie jonów wynosi w tych warunkach zaledwie 1: 20 000 000. Działanie to nosi nazwę efektu oligodynamicznego, a jego mechanizm nie jest jasny, mimo wielu wysuwanych hipotez (Kostowski W., Herman Z. (red.): *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. PZWL Warszawa 2003; wyd. III; Tom II, s. 271; Kostowski W., Kubikowski P.: Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii*

klinicznej. Wyd. III. PZWL Warszawa 1991, s. 740–741). Jedną z hipotez upatruje efekt oligodynamiczny w zakłócaniu rozmieszczenia ładunków jonowych w obrębie błon komórkowych, zakłócanie biegunowości komórki. Wiele metali destabilizuje (poprzez przyłączanie się) również strukturę kluczowych białek (enzymów, białek kanałowych) i kwasów nukleinowych.

Choroby zwierząt i ludzi, wywołane przez pierwotniaki, są przyczyną znacznej zachorowalności i śmiertelności na całym świecie. Stosowanie chemioterapeutyków w leczeniu zakażeń pierwotniakowych okazało się być problematyczne, ze względu na narastającą lekooporność, zmienną skuteczność między szczepami lub gatunkami oraz toksyczność. Istnieje silna potrzeba znalezienia nowych, skutecznych rozwiązań do leczenia tych chorób.

Podczas analizy doniesień literaturowych i opisu stanu techniki zaobserwowano, iż publikowane badania w głównej mierze opierają się na analizie właściwości hamujących rozwój pierwotniaków (IC₅₀ i IC₁₀₀) w okresie 24 do 72 godzin. Zdecydowanie mniejszy odsetek badaczy wykonywał analizy pod kątem dawki śmiertelnej dla pierwotniaków.

Zastosowanie surowców roślinnych, w terapii pasożytów, jest powszechne w medycynie naturalnej i tradycyjnej. Dotychczasowe badania wykazały, że rośliny lecznicze zawierają związki aktywne, które wykazują silne działanie przeciwko pierwotniakom. Przykładem powszechnie stosowanego naturalnego środka przeciwpasożytniczego pochodzenia roślinnego jest chinina – alkaloid z kory drzewa chinowego, artymizyna – seskwiterpen z *Artemisia annua* oraz *Artemisia indica* (*Hygeia Public Health* 2014, 49(3): 442–448).

Opublikowano także wiele doświadczeń naukowych, w których wykazano (in vitro i in vivo) hamowanie rozwoju pierwotniaków przez zastosowanie ekstraktów roślinnych i wyselekcjonowanych z nich metabolitów wtórnych: olejków eterycznych, alkaloidów, związków fenolowych (*Natural products as sources of antiprotozoal drugs. Current Opinion in Anti-infective Investigational Drugs* 2000; 2, 47–62).

Znane są oparte na miedzi kompleksy działające poprzez interakcje z DNA pierwotniaków, np. *Trypanosoma cruzi*. Becco i in. wykazali wpływ hamujący na rozwój 50% populacji (IC₅₀) dla syntezowanych przez siebie związków na poziomie 3.9 ± 1.5 do 11.3 ± 3.8 μM , w porównaniu do leku Nifurtimox (6 μM). Wartość IC₁₀₀ osiągnięto dla analizowanych związków przy stężeniu > 20 μM (Becco, L., Rodriguez, A., Bravo, M. E., Prieto, M. J., Ruiz-Azuara, L., Garat, B., Moreno V., Gambino, D. (2012). *New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeinas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. Journal of inorganic biochemistry*, 109, 49–56).

Inni badacze zaproponowali kompleksy wanadu z 2,2'-bipirydyny lub dipirydyno[3,2-a: 2',3'-c]fenazyny oraz semikarbazyd aldehydu salicylowego lub jego pochodną semikarbazyd aldehydu 5-bromo-salicylowego. Podobnie jak w przypadku poprzednich badaczy substancją do, której autorzy odnieśli swoje wyniki był nifurtimoks. Uzyskali oni wyniki IC₅₀, dla czterech wariantów kompleksów, w przedziale 13–84 μM (Benitez, J., L. Guggeri, I. Tomaz, G. Arrambide, M. Navarro, J. Costa Pessoa, B. Garat and D. Gambino (2009). "Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents." *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(4): 609–616).

Podobne analizy przeprowadziły dwa zespoły badaczy Martins i in. oraz Paixão i in.. W swoich badaniach skupili się na wykorzystaniu jonów miedzi do stworzenia kompleksów wykazujących właściwości przeciwko *Trypanosoma cruzi*. Pierwsza grupa badaczy z powodzeniem wykorzystwała do stworzenia kompleksów powszechnie stosowane antybiotyki (lewofloksacyne i sparfloksacyne) (Martins, D. A., Gouvea, L. R., Batista, D. D. G. J., Da Silva, P. B., Louro, S. R., Maria de Nazaré, C. S., & Teixeira, L. R. (2012). *Copper (II) fluoroquinolone complexes with anti-Trypanosoma cruzi activity and DNA binding ability. BioMetals*, 25(5), 951–960). Natomiast Paixão i in., podobnie jak Benitez i in., stworzyli kompleksy o ogólnym wzorze $[\text{Cu}(\text{N}_\text{O})(\text{N}_\text{N})]^{2+}$, z wykorzystaniem 2-metoksybenzhydrazyd, 4-metoksybenzhydrazyd oraz trzy ligandy α -diiminowe: 1,10-fenantrolinę, 2,2'-bipirydynę i 4-4'-dimetoksy-2-2'-bipirydynę (Paixão, D. A., Lopes, C. D., Carneiro, Z. A., Sousa, L. M., de Oliveira, L. P., Lopes, N. P., Pivatto M., Chaves J.D.S., de Almeida M.V., Ellena J., Moreira M.B., Netto A.V.G., de Oliveira R.J., Guilardi S., de Albuquerque S., Guerra W Moreira, M. B. (2019). *In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of ternary copper (II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 157–166).

Kompleksy sulfoaminoamidowe z ugrupowaniem 8-aminochinolinowym miedzi i cynku wykazały skuteczność wobec patogennych szczepów *Leishmania braziliensis*, *chagasi* i *Trypanosoma cruzi*. Ich najniższe IC₅₀ określono na 0,35 mM (około 0,034%) w warunkach laboratoryjnych (Everson da Silva, L., Teixeira, D. S.J., Nunes Maciel, E., Korting Nunes, R., Eger, I., Steindel, M., & Andrade Rebelo,

R. (2010). *In vitro* antiprotozoal evaluation of zinc and copper complexes based on sulfonamides containing 8-aminoquinoline ligands. *Letters in Drug Design & Discovery*, 7(9), 679–685).

Inne syntetyczne kompleksy metali tj. manganu, kobaltu, niklu w postaci 4'-(2-ferrocenyl)-2,2':6'2"-terpyridyniowych pochodnych w warunkach *in vitro* były bardzo skuteczne przy stężeniu 1,1 mM wobec *Plasmodium falciparum*. Autorzy udowodnili skuteczność mieszanin soli manganu, żelaza, kobaltu, niklu i miedzi (Al-Khodir, F. A. I., & Refat, M. S. (2017). *Investigation of coordination ability of Mn (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), and Cu (II) with metronidazole, the antiprotozoal drug, in alkaline media: Synthesis and spectroscopic studies. Russian Journal of General Chemistry*, 87(4), 873–879).

Wykazano również możliwości skutecznego tworzenia kompleksów i powszechnie stosowanym antybiotykiem o silnym działaniu przeciwpierwotniaczym (Metronidazol), z metalami m.in. Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), i Cu(II) (Al-Khodir, F. A. I. and M. S. Refat (2017). "Investigation of coordination ability of Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), and Cu(II) with metronidazole, the antiprotozoal drug, in alkaline media: Synthesis and spectroscopic studies. "Russian Journal of General Chemistry 87(4): 873–879).

Wzmocnienie aktywności przeciwpierwotniakowych jonów metali miedzi i cynku w syntetycznych kompleksach organicznych imidazopirydyniowych i diarylopiperydyniowych znalazły również swoją ochronę patentową. I tak, w patencie US6291480B1 oraz US20060178358 udowodniono aktywność pochodnych diarylopierydydylowych wobec *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* oraz *Emerica* gatunków: *tenella*, *acervulina*, *necatrix*, *brunetti maxima*. Innym przykładem zastosowań przeciwpierwotniakowych kompleksów metali, w tym miedzi i niskocząsteczkowych związków bioorganicznych (US20110207701 A1).

Dotychczasowe badania nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi pokazały bardzo silne działanie olejków eterycznych. Escobar, P i in. przeprowadzili badania właściwości przeciwpierwotniaczych dla 5 roślin z rodzaju *Lippia*. Pozyskane olejki przeanalizowali pod kątem hamowania rowoju pierwotniaków na *Trypanosoma cruzi* oraz *Leishmania chagasi*, w odniesieniu nifurtimoksu. Uzyskali oni wartości IC₅₀ od 4,4 do >100 µg/ml, natomiast w przypadku nifurtimoksu wartość ta wyniosła 0,3–0,4 µg/ml (Escobar, P., Milena Leal, S., Herrera, L. V, Martinez, J. R., & Stashenko, E. (2010). *Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian Lippia spp essential oils and their major components. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 184–190).

Podobnie ze zgłoszenia WO2008101131 A1 znana jest kompozycja do zabijania lub odpychania pasożytów zewnętrznych i/lub szkodników, zawierająca co najmniej 3% olejku eterycznego *Lippia javanica* i co najmniej jeden inny olejek eteryczny.

Inna grupa badaczy wykazała wpływ olejków eterycznych z *Annona coriacea* na *Trypanosoma cruzi* oraz różne gatunki leiszmani (*Leishmania* (L.): amazonensis, braziliensis, chagasi, major). Do analizy porównawczej wykorzystano dwa powszechnie stosowane, w przypadku wystąpienia leiszmaniozy, związki pentamidynę oraz benznidazol. Uzyskane wartości dla olejków eterycznych (39,93–261,20 µg/mL) były znacznie wyższe niż dla testowanych leków (odpowiednio 0,06–0,22 µg/mL i 45,02 µg/mL) (Siqueira, C. A. T, J. Oliani, A. Sartoratto, C. L. Queiroga, P. R. H. Moreno, J. Q. Reimão, A. G. Tempom and D. C. H. Fischer (2011). "Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. "Revista Brasileira de Farmacognosia 21: 0–0).

Perez i in. w swojej pracy przeglądowej zebrali informację o właściwościach przeciwpierwotniaczych, IC₅₀ (*Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania sp*, *Trypanosoma cruzi*) dla m.in. olejku tymiankowego, czosnkowego, bazyliowego, lawendowego, herbacianego czy też krwawnikowego. Wykazali oni właściwości przeciwpierwotniakowe olejków eterycznych w bardzo szerokim przedziale stężeń, od 8.3 ng/ml do 8 mg/ml (Pérez, S., M. Ramos-Lopez, E. Sánchez-Miranda, M. Fresan-Orozco and J. Pérez-Ramos (2012). "Antiprotozoa activity of some essential oils." *Journal of medicinal plant research* 6: 2901–2908).

Monzote i in. zebrali w swojej pracy doniesienia literaturowe dotyczące właściwości przeciwpasożytniczych olejków eterycznych, które powstały na przestrzeni lat 1988–2012. Prezentują oni znaczny wzrost zainteresowania i ilości badań nad zastosowaniem olejków eterycznych w zwalczaniu pierwotniaków (Monzote, L., O. Alarcón and W. Setzer (2012). "Antiprotozoal Activity of Essential Oils." *Agriculturae Conspectus Scientificus* 77: 167–175).

Natomiast Moon i in., w pracy badawczej, przedstawili właściwości pierwotniakobójcze dwóch olejków lawendowych przeciwko *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* oraz *Hexamita inflata*. Wykazały one iż stężenie 0,1% olejku lawendowego działa bójczo w stosunku do analizowanych pierwotniaków (Moon, T, J. Wilkinson and H. Cavanagh (2006). "Antiparasitic activity of two *Lavandula essential*

oils against Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis and Hexamita inflata. "Parasitology research 99: 722–728).

Natomiast ze zgłoszenia EP2070427 A1 znane jest zastosowanie co najmniej jednego związku olejku eterycznego wybranego z grupy składającej się z aldehydu cynamonowego, 2-decenalu i nerolidolu jako lub w preparacie histomonastatu. Korzystnie związek olejku eterycznego jest dodatkowo łączony z co najmniej jednym związkiem wybranym z grupy obejmującej p-cymen, tymol, aldehyd salicylowy, olejek z drzewa herbacianego, olejek miętowy, aldehyd kuminowy, kwas cynamonowy, cynamon alkohol, farnesal i farnesyloaceton.

Ze zgłoszenia EP2119363 A2 znana jest kompozycja przeciwdrobnoustrojowa na bazie olejków eterycznych roślin, o zwiększonej skuteczności przeciwdrobnoustrojowej, zawierająca: co najmniej dwa olejki eteryczne z roślin jako główny składnik; i niewielką, ale przeciwbakteryjnie skuteczną ilość wzmacniacza wybranego z grupy składającej się z polijonowych organicznych wzmacniaczy (np. polietylenoimina) i polijonowych nieorganicznych wzmacniaczy (np. tripolifosforan sodu, heksametafosforan sodu).

Z dokumentu US2014106012 AA znana jest kompozycja zawierająca: olejek eteryczny wybrany z grupy obejmującej olejek anyżowy, olejek rozmarynowy, olejek nagietkowy, olejek z drzewa herbacianego, olejek sasafasowy, olejek quasi, olejek cynamonowy, olejek goździkowy, olejek eukaliptusowy, olejek lawendowy, olejek miętowy, lub ich kombinacje; od około 10 procent do około 30 procent (v/v) alkoholu izopropylowego; od około 30 procent do około 50 procent (v/v) mirystynianu izopropylu; od około 5 procent do około 20 procent (v/v) oleju silikonowego; i od około 5 procent do około 25 procent (v/v) trójglicerydu kaprynowego/kaprylowego.

Z dokumentu EP1512409 B1 znana jest wodna kompozycja do zwalczania wszy głowowych i ich jaj, która zawiera jako składniki aktywne co najmniej jeden olejek eteryczny, znamienna tym, że kompozycja zawiera ponadto napar z: suszonych liści mięty pieprzowej, herbaty i czosnku. Natomiast ujawniony sposób wytwarzania wspomnianej kompozycji obejmuje następujące etapy: wykonanie naparu z liści mięty pieprzowej, herbaty i czosnku we wrzącej wodzie i pozostawienie do ostygnięcia, dodanie olejków eterycznych do schłodzonego naparu, a następnie zmieszanie ochłodzonego naparu z surfaktantami i środkami zagęszczającymi z wytworzeniem żelu.

Z patentu EP 1089745 B1 znane jest zastosowanie ekstraktu z oregano lub produktu metabolicznego ekstraktu z oregano do wytwarzania leku do zmniejszania lub eliminowania ameby jelitowej wybranej z grupy obejmującej *Entamoeba hartmanni*, *Blastocystis hominis*, *Endolimax nana* i *Entamoeba histolytica* u ludzi potrzebujących leczenia przeciwpiętrotniakowego. Przy czym ujawniony lek jest stosowany do podawania w postaci zemułgowanej tabletki o przedłużonym uwalnianiu zawierającej karwakrol jako składnik aktywny.

Natomiast z dokumentu US2014037698 AA (EP2666364 (B1) znany jest dodatek do paszy dla zwierząt zawierający połączenie soli kwasu organicznego z co najmniej jednym składnikiem aktywnym pochodzenia roślinnego, połączenie to częściowo pokryte olejami roślinnymi i/lub tłuszczami. Przy czym, aktywne składniki pochodzenia roślinnego obejmują olejki eteryczne wybrane z grupy składającej się z imbiru, piperyny, oregano, tymolu, karwakrolu, aldehydu cynamonowego, czosnku i ich kombinacji. Natomiast kwas organiczny korzystnie wybrany jest z grupy obejmującej masłowy, propionowy, mrówkowy, mlekowy, cytrynowy, laurynowy, kaprynowy, kaprylowy, kaprynowy i octowy. Dodatek ma właściwości przeciwpiętrotniakowe.

Celem wynalazku jest zapewnienie nowej kompozycji do zwalczania piętrotniaków o właściwościach bójczych.

Istotą wynalazku jest kompozycja piętrotniakobójcza do leczenia i/lub zapobiegania chorobom wywołanym przez piętrotniaki u ludzi zawierająca olejek herbaciany, charakteryzująca się tym, że olejek herbaciany występuje w postaci kompleksu z kwasem organicznym i metalem.

Korzystnie kwas organiczny jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.

Korzystnie metal jest wybrany z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich tlenki lub sole.

Korzystnie stosunek olejku herbacianego do kwasu organicznego wynosi od 1:80 do 80:1.

Korzystnie stosunek olejku herbacianego do kwasu organicznego wynosi 1:1.

Kolejną istotą wynalazku jest sposób wytwarzania kompozycji piętrotniakobójczej według wynalazku, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) zmieszanie olejku herbacianego z kwasem organicznym w stosunku wagowym od 80:1 do 1:80;
- b) dodanie katalizatora do mieszaniny z etapu a)

- c) dodawanie metalu wybranego z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich sole, lub tlenki;
- d) ogrzewanie mieszaniny z katalizatorem uzyskanej w etapie c) do temperatury wrzenia oraz kontynuowanie ogrzewania w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 20–120 minut;
- e) odstawienie produktu reakcji do wystygnięcia na okres od 10 do 24 godzin;
- f) filtrowanie ostudzonego produktu reakcji

Korzystnie kwas organiczny stosowany w etapie a) jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.

Korzystnie jako katalizator stosuje się mieszaninę siarczynu kobaltu, molibdenianu amonu oraz chlorku lub siarczynu manganu.

Wynalazek dostarcza następujących korzyści:

- właściwości pierwotniakobójcze kompozycji zapewniają całkowitą eliminację infekcji;
- kompozycja według wynalazku działa w niskich stężeniach;
- kompozycja według wynalazku wykazuje szerokie spektrum działania – tj. wykazuje dobre działanie bójcze wobec wielu gatunków pierwotniaków;
- kompozycja według wynalazku może stanowić alternatywę dla chemioterapeutyków pierwotniakobójczych (Antiprotozoal), takich jak np. metronidazol, albendazol, tynidazol, sulfonamidy, chlorochina lub może też stanowić dodatek do chemioterapeutyków przeciwpierwotniakowych, zmniejszający ryzyko powstania oporności na dany lek.

Wynalazek szczegółowo przedstawiono w poniższych przykładach wykonania, przy czym wszystkie opisane poniżej testy i procedury doświadczalne przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów testowych, odczynników i aparatury, postępując zgodnie z zaleceniami producentów stosowanych zestawów, odczynników i aparatury, o ile nie wskazano wyraźnie inaczej. Wszelkie parametry testowe mierzono z zastosowaniem standardowych, powszechnie znanych metod stosowanych w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek.

Wszystkie wykorzystane do badań surowce dopuszczone są zarówno do żywienia zwierząt jak i ludzi przez odpowiednie dyrektywy oraz organy. Doboru surowców dokonano na podstawie Codex Alimentarius, czyli Kodeksu Żywnościowego utworzonego przez FAO i WHO, Der Deutsche Arzneimittel-Codex (DAC), wytycznych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority – EF SA) oraz Rozporządzenia (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt Ponadto olejki eteryczne wykorzystane do badań spełniały wymagania Farmakopei Europejskiej, Szwajcarskiej oraz Der Deutsche Arzneimittel-Codex (DAC)

Natomiast do badań *in vitro* aktywności przeciwpierwotniakowej kompozycji według wynalazku wytypowano 5 organizmów reprezentujących grupy taksonomiczne, do których należą pierwotniaki chorobotwórcze, tj.:

- *Amoeba proteus* – pełzak odmieniec – pierwotniak z rzędu *Euamoebida*, należący do supergrupy 5 *Amoebozoa*, żyjący w wodach.
- *Paramecium caudatum* – pantofelek ogoniasty reprezentujący orzęski *Ciliata*, żyjący w wodach.
- *Gregarina blattarum* – gregaryna izolowana z karaczanów, reprezentujący typ *Apicomplexa*, żyjący w przewodach pokarmowych lub jamach ciała bezkręgowców.
- *Euglena gracilis* – pierwotniak żyjący w wodach, reprezentujący wiciowce – *Mastigophora*, rodzinę *Euglenaceae*.
- *Trichomonas hominis* – pierwotniak żyjący w jelicie grubym człowieka, reprezentujący *Trichomonadidae*.

Przy czym, *Amoeba*, *Paramecium*, *Trichomonas* i *Euglena* obserwowano pod mikroskopem na szkiełkach zegarkowych z włóknami waty wiskozowej (w celu ułatwienia obserwacji) w kropli wody z hodowli, z której pochodziły. Do prób badanych wprowadzono różne koncentracje badanych kompozycji, ustalając dawkę LD₅₀ (śmiertelność 50%) i dawkę LD₁₀₀ (śmiertelność 100%). We wszystkich przypadkach zastosowano 4-krotne powtórzenia badania wraz z próbą ślepą.

Gregaryny izolowano z karaczanów i po umieszczeniu na szkiełku zegarkowym, w roztworze Ringera, poddawano działaniu produktów w różnym stężeniu. Każda próbka obejmowała dziesięć osobników. Ustalano śmiertelne stężenie substancji dla 50% i 100% osobników (LD₅₀, LD₁₀₀) w ciągu 3 minut.

Izolacji gregaryn z karaczanów dokonano na podstawie sposobu izolacji gregaryn z chrząszczy zaproponowanego przez J. Moraczewskiego (*Moraczewski J.: Ćwiczenia z zoologii bezkręgowców. Wydanie I, PWN, Warszawa 1974 r., s. 29–31, 285–292.*

Identyfikacji poszczególnych pierwotniaków dokonano na podstawie ich opisów i rysunków za W.A. Dogiel oraz J. Hempel-Zawitkowską (*Dogiel W.A.: Zoologia bezkręgowców. Wydanie III, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne 1972 r.; Hempel-Zawitkowska J., Gałka B., Kalińska B., Kamionek M., Komosińska H., Pezowicz E. Podsiadło E., Sulgostowska T.: Zoologia dla uczelni rolniczych. Wydawnictwo Naukowe PWN 2008 r.*).

Wszystkie badane preparaty (tj. kompozycje według wynalazku oraz próby kontrolne), przed podaniem na szkiełko zegarkowe, rozpuszczano w roztworze wodnym polisorbatu 80 (0,05%). Nie stwierdzono działania bójczonego polisorbatu 80 w ww. stężeniu.

Przykład 1

Połączenie olejku herbacianego (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche) z kwasami (octowy, propionowy, mlekowy) w stosunku 1:1 oraz metalem (miedzią, manganem i cynkiem).

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania przygotowano dziewięć następujących kompozycji:

- a) kompozycję I – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i miedzią
- b) kompozycję II – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i manganem
- c) kompozycję III – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i cynkiem
- d) kompozycję IV – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i miedzią
- e) kompozycję V – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i manganem
- f) kompozycję VI – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i cynkiem
- g) kompozycję VII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym i miedzią
- h) kompozycję VIII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym oraz manganem
- i) kompozycję IX – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym i cynkiem.

Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano sole metali w postaci węglanów, natomiast w kompozycji według wynalazku można stosować również inne sole (np. chlorki, siarczany) lub inne formy, np. tlenki.

W celu wytworzenia kompozycji I, do 100 ml olejku eterycznego dodano 100 ml kwasu octowego, 0,6 g katalizatora (zawierającego siarczan kobaltu, molibdenian amonu oraz chlorek manganu w stosunku 1:1:1) oraz 5 g węglanu miedzi. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia, do czasu zmiany barwy, pod chłodnicą zwrotną przez 20 minut. Następnie mieszaninę pozostawiono do wychłodzenia (przez 10 godzin) i uzyskania klarownego roztworu (jedno, dwu lub trójfazowego). Po tym czasie produkt reakcji filtrowano przez bibułę filtracyjną. Kompozycje II–IX wytworzono analogicznie do kompozycji I.

Kompozycje I–IX zostały następnie poddane analizie pod kątem ich właściwości pierwotniakobójczych. W tym celu kompozycje rozcieńczano: 0,001% do 1%, po czym umieszczano w poszczególnych rozcieńczeniach pierwotniaki.

- *Amoeba proteus* – pełzak odmieniec – pierwotniak z rzędu *Euamoebida*, należący do supergrupy *Amoebozoa*, żyjący w wodach;
- *Paramecium caudatum* – pantofelek ogoniasty reprezentujący orzęski *Ciliata*, żyjący w wodach;
- *Gregarina blattarum* – gregaryna izolowana z karaczanów, reprezentujący typ *Apicomplexa*, żyjący w przewodach pokarmowych lub jamach ciała bezkręgowców;
- *Euglena gracilis* – pierwotniak żyjący w wodach, reprezentujący wiciowce – *Mastigophora*, rodzinę *Euglenaceae*.
- *Trichomonas hominis* – pierwotniak żyjący w jelicie grubym człowieka, reprezentujący *Trichomonadidae*.

Analizie właściwości pierwotniakobójczych poddano poszczególne kwasy, roztwór katalizatora, olejek herbaciany oraz roztwory soli metali. Badane preparaty, przed podaniem na szkiełko zegarkowe, rozpuszczano w roztworze wodnym polisorbatu 80 (0,05%). Nie stwierdzono działania bójczego polisorbatu 80 w ww. stężeniu. Prowadzono obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym z kontrastem fazowym. Aktywność pierwotniakobójczą uznano za efektywną gdy nastąpiła śmierć 50% i 100% osobników w ciągu 3 minut. Kontrolne substancje przeciwpierwotniakowe stanowiły CH – chloramfenikol oraz M – metronidazol.

Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono w tabeli 1 oraz tabeli 2. Przy czym, w tabeli 1 umieszczono wyniki aktywności przeciw pierwotniakowej prób kontrolnych, tj. kontrolnych substancji przeciw pierwotniakowych oraz poszczególnych elementów składowych kompozycji I–IX. Natomiast aktywność kompozycji I–IX przedstawiono w tabeli 2.

Przeprowadzona analiza wykazała, że działanie bójcze i statyczne w układach złożonych i po zajściu reakcji było wyższe niż działanie substancji z osobna, wchodzących w skład mieszanin reakcyjnych i kompleksów. Kompozycje I–X wykazują wielokrotnie silniejszą (potencjalizacja) aktywność pierwotniakobójczą niż każdy z tych składników z osobna. Wszystkie wykorzystane składniki kompozycjach według wynalazku są dopuszczone zarówno do żywienia zwierząt jak i ludzi przez odpowiednie dyrektywy oraz organy, co w połączeniu z ich wysoką skutecznością pozwala na ich zastosowanie w leczeniu i/lub profilaktyce parazytoz u ludzi, wywoływanych przez pierwotniaki. W szczególności histomonadozy (wywołanej przez *Histomonas meleagridis*), kokcydiozy (wywołanej przez *Eimeria*), cryptosporidiozy (wywołanej przez *Cryptosporidium*), trichomonadozy (wywołanej przez *Trichomonas*), babeszjozy (wywołanej przez *Babesia*), czy ameboz (wywołanych przez *Amoeba*).

Tabela 1. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ dla wykorzystanych w badaniu prób kontrolnych

Próba	CH*	M**	Kwas octowy	Kwas propionowy	Kwas mlekowy	Roztwór chloru manganu	Roztwór węglanu miedzi	Roztwór węglanu cynku	Roztwór katalizatora	Olejek herbaciany (<i>Melaleuca alternifolia</i> Maiden & Betche)
Pierwotniak										
<i>Engleina gracilis</i>	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,1%	LD ₅₀ : LD ₁₀₀ :	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,5% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,6% LD ₁₀₀ : 1,3%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,1%	LD ₅₀ : 0,15% LD ₁₀₀ : 0,25%	LD ₅₀ : 0,1% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,1%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,1%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : LD ₁₀₀ :	LD ₅₀ : 0,13% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,12% LD ₁₀₀ : 0,37%	LD ₅₀ : 0,2% LD ₁₀₀ : 0,4%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,03%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,15%	LD ₅₀ : 0,3% LD ₁₀₀ : 0,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,6% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1,4%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,09% LD ₁₀₀ : 0,17%	LD ₅₀ : 0,15% LD ₁₀₀ : 0,25%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : LD ₁₀₀ :	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,3%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,25%	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,25%	LD ₅₀ : 0,35% LD ₁₀₀ : 0,5%	LD ₅₀ : 0,3 LD ₁₀₀ : 0,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,25%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,025%
<i>Trichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : LD ₁₀₀ :	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,1%	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,95% LD ₁₀₀ : 1,3%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,1% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,25% LD ₁₀₀ : 0,4%	LD ₅₀ : 0,09% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,09% LD ₁₀₀ : 0,1%

*CH – chloramfenikol, M** – metronidazol

Tabela 2. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ kompozycji I-IX, wyznaczone dla wybranych pierwotniaków

Próba	Olejek herbaciany (<i>Melaleuca alternifolia</i> Maiden & Betche)											
	Kwas octowy				Kwas propionowy				Kwas mlekowy			
	miedź	mangan	cynek		miedź	mangan	cynek		miedź	mangan	cynek	
Pierwotniak	Kompozycja I	Kompozycja II	Kompozycja III	Kompozycja IV	Kompozycja V	Kompozycja VI	Kompozycja VII	Kompozycja VIII	Kompozycja IX			
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,002%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,003%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%			
<i>Giregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%			
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,001%	LD ₅₀ : 0,007% LD ₁₀₀ : 0,009%	LD ₅₀ : 0,006% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,006% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,003%			
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,002%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,009%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%			
<i>Trichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0,009% LD ₁₀₀ : 0,035%	LD ₅₀ : 0,008% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,007% LD ₁₀₀ : 0,025%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,007% LD ₁₀₀ : 0,009%	LD ₅₀ : 0,007% LD ₁₀₀ : 0,009%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,045%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%			

Przykład 2

Połączenie olejku herbacianego (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche) z kwasami (octowy, propionowy, mlekowy) w stosunku 80:1 oraz metalem (miedzią, manganem i cynkiem).

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania przygotowano dziewięć następujących kompozycji:

- a) kompozycję X – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i miedzią
- b) kompozycję XI – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i manganem
- c) kompozycję XII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i cynkiem
- d) kompozycję XIII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i miedzią
- e) kompozycję XIV – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i manganem
- f) kompozycję XV – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i cynkiem
- g) kompozycję XVI – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym i miedzią
- h) kompozycję XVII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym i manganem
- i) kompozycję XVIII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym i cynkiem.

Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano sole metali w postaci tlenków, natomiast w kompozycji według wynalazku można stosować również inne formy, takie jak sole (np. chlorki, siarczany, węglany).

W celu wytworzenia kompozycji X, do 80 ml olejku eterycznego dodano 1 ml kwasu octowego, 0,1 g katalizatora (zawierającego siarczan kobaltu, molibdenian amonu oraz siarczan manganu zmieszane w stosunku 1:1:1) oraz 1 g tlenku miedzi. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia, do czasu zmiany barwy, pod chłodnicą zwrotną przez 120 minut. Następnie mieszaninę pozostawiono do wychłodzenia (przez 24 godziny) i uzyskania klarownego roztworu (jedno, dwu lub trójfazowego). Po tym czasie produkt reakcji filtrowano przez bibułę filtracyjną. Kompozycje XI–XVIII wytworzono analogicznie do kompozycji X. Kompozycje X–XVIII zostały następnie poddane analizie pod kątem ich właściwości pierwotniakobójczych analogicznie jak w przykładzie 1, a wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ kompozycji X-XVIII, wyznaczone dla wybranych pierwotniaków

Próba	Olejek herbaciany (<i>Melaleuca alternifolia</i> Maiden & Betche)											
	Kwas octowy				Kwas propionowy				Kwas mlekowy			
	miedź	mangan	cynek	cynek	miedź	mangan	cynek	cynek	miedź	mangan	cynek	cynek
Pierwotniak	Kompozycja X	Kompozycja XI	Kompozycja XII	Kompozycja XIII	Kompozycja XIV	Kompozycja XV	Kompozycja XVI	Kompozycja XVII	Kompozycja XVIII			
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0,035% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,035% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,045% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,035% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,045% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,08%			
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0,018% LD ₁₀₀ : 0,023%	LD ₅₀ : 0,014% LD ₁₀₀ : 0,018%	LD ₅₀ : 0,019% LD ₁₀₀ : 0,023%	LD ₅₀ : 0,016% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,01% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,009% LD ₁₀₀ : 0,014%	LD ₅₀ : 0,01% LD ₁₀₀ : 0,015%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,02%			
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0,018% LD ₁₀₀ : 0,035%	LD ₅₀ : 0,022% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,017% LD ₁₀₀ : 0,025%	LD ₅₀ : 0,019% LD ₁₀₀ : 0,03%	LD ₅₀ : 0,024% LD ₁₀₀ : 0,03%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,035%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,028%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,035%			
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,012% LD ₁₀₀ : 0,017%	LD ₅₀ : 0,012% LD ₁₀₀ : 0,016%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,018%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,01% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,019%	LD ₅₀ : 0,014% LD ₁₀₀ : 0,018%	LD ₅₀ : 0,01% LD ₁₀₀ : 0,02%			
<i>Trichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0,08% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,78%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,08% LD ₁₀₀ : 0,09%	LD ₅₀ : 0,078% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,075%			

Przykład 3

Połączenie olejku herbacianego (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche) z kwasami (octowy, propionowy, mlekowy) w stosunku 1:80 oraz metalem (miedzią, manganem i cynkiem).

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania przygotowano dziewięć następujących kompozycji:

- a) kompozycję XIX – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i miedzią
- b) kompozycję XX – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i manganem
- c) kompozycję XXI – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem octowym i cynkiem
- d) kompozycję XXII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i miedzią
- e) kompozycję XXIII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i manganem
- f) kompozycję XXIV – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem propionowym i cynkiem
- g) kompozycję XXV – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym i miedzią
- h) kompozycję XXVI – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym oraz manganem
- i) kompozycję XXVII – tj. kompozycję olejku herbacianego z kwasem mlekowym i cynkiem.

Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano sole metali w postaci węglanów, natomiast w kompozycji według wynalazku można stosować również inne sole (np. chlorki, siarczany) lub inne formy, np. tlenki.

W celu wytworzenia kompozycji XIX, do 1 ml olejku herbacianego dodano 80 ml kwasu octowego, 1 g katalizatora (który stanowi siarczan kobaltu, molibdenian amonu oraz chlorek manganu zmieszane w stosunku 1:1:1) oraz 5 g węglanu miedzi. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia, do czasu zmiany barwy, pod chłodnicą zwrotną przez 60 minut. Następnie mieszaninę pozostawiono do wychłodzenia (przez 12 godzin) i uzyskania klarownego roztworu (jedno, dwu lub trójfazowego). Po tym czasie produkt reakcji filtrowano przez bibułę filtracyjną. Kompozycje XX–XXVII wytworzono analogicznie do kompozycji XIX. Kompozycje XIX–XXVII zostały następnie poddane analizie pod kątem ich właściwości pierwotniakobójczych analogicznie jak w przykładzie 1, a wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ kompozycji XIX-XXVII, wyznaczone dla wybranych pierwotniaków

Próba	Olejek herbaciany (<i>Melaleuca alternifolia Maiden & Betche</i>)														
	Kwas octowy				Kwas propionowy				Kwas mlekowy						
	miedź	mangan	cynek	miedź	mangan	cynek	miedź	mangan	cynek	miedź	mangan	cynek	miedź	mangan	cynek
Pierwotniak	Kompozycja XIX	Kompozycja XX	Kompozycja XXI	Kompozycja XXII	Kompozycja XXIII	Kompozycja XXIV	Kompozycja XXV	Kompozycja XXVI	Kompozycja XXVII						
<i>Englena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0,042% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,044% LD ₁₀₀ : 0,087%	LD ₅₀ : 0,047% LD ₁₀₀ : 0,093%	LD ₅₀ : 0,042% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,035% LD ₁₀₀ : 0,078%	LD ₅₀ : 0,038% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,042% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,043% LD ₁₀₀ : 0,086%	LD ₅₀ : 0,044% LD ₁₀₀ : 0,09%						
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0,018% LD ₁₀₀ : 0,023%	LD ₅₀ : 0,017% LD ₁₀₀ : 0,022%	LD ₅₀ : 0,019% LD ₁₀₀ : 0,025%	LD ₅₀ : 0,022% LD ₁₀₀ : 0,027%	LD ₅₀ : 0,019% LD ₁₀₀ : 0,024%	LD ₅₀ : 0,016% LD ₁₀₀ : 0,019%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,017% LD ₁₀₀ : 0,022%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,026%						
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0,017% LD ₁₀₀ : 0,035%	LD ₅₀ : 0,018% LD ₁₀₀ : 0,045%	LD ₅₀ : 0,021% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,022% LD ₁₀₀ : 0,042%	LD ₅₀ : 0,026% LD ₁₀₀ : 0,039%	LD ₅₀ : 0,024% LD ₁₀₀ : 0,038%	LD ₅₀ : 0,026% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,026% LD ₁₀₀ : 0,043%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,044%						
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0,017% LD ₁₀₀ : 0,021%	LD ₅₀ : 0,016% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,013% LD ₁₀₀ : 0,017%	LD ₅₀ : 0,013% LD ₁₀₀ : 0,016%	LD ₅₀ : 0,018% LD ₁₀₀ : 0,02%	LD ₅₀ : 0,016% LD ₁₀₀ : 0,019%	LD ₅₀ : 0,014% LD ₁₀₀ : 0,018%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,018%	LD ₅₀ : 0,017% LD ₁₀₀ : 0,021%						
<i>Trichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0,078% LD ₁₀₀ : 0,086%	LD ₅₀ : 0,086% LD ₁₀₀ : 0,093%	LD ₅₀ : 0,077% LD ₁₀₀ : 0,084%	LD ₅₀ : 0,083% LD ₁₀₀ : 0,088%	LD ₅₀ : 0,078% LD ₁₀₀ : 0,084%	LD ₅₀ : 0,082% LD ₁₀₀ : 0,089%	LD ₅₀ : 0,085% LD ₁₀₀ : 0,093%	LD ₅₀ : 0,085% LD ₁₀₀ : 0,089%	LD ₅₀ : 0,074% LD ₁₀₀ : 0,08%						

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja pierwotniakobójcza do leczenia i/lub zapobiegania chorob wywoływanych przez pierwotniaki u ludzi, zawierająca olejek herbaciany, **znamienna tym**, że olejek herbaciany występuje w postaci kompleksu z kwasem organicznym i metalem.
2. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że kwas organiczny jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.
3. Kompozycja według zastrz. 1 albo 2, **znamienna tym**, że metal jest wybrany z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich tlenki lub sole.
4. Kompozycja według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 3, **znamienna tym**, że stosunek olejku herbacianego do kwasu organicznego wynosi od 1:80 do 80:1.
5. Kompozycja według zastrz. 4, **znamienna tym**, że stosunek olejku herbacianego do kwasu organicznego wynosi 1:1.
6. Sposób wytwarzania kompozycji pierwotniakobójczej, według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 5, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a) zmieszanie olejku herbacianego z kwasem organicznym w stosunku wagowym od 80:1 do 1:80;
 - b) dodanie katalizatora do mieszaniny z etapu a)
 - c) dodawanie metalu wybranego z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich sole, lub tlenki;
 - d) ogrzewanie mieszaniny z katalizatorem uzyskanej w etapie c) do temperatury wrzenia oraz kontynuowanie ogrzewania w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 20–120 minut;
 - e) odstawienie produktu reakcji do wystygnięcia na okres od 10 do 24 godzin;
 - f) filtrowanie ostudzonego produktu reakcji.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że kwas organiczny stosowany w etapie a) jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.
8. Sposób według zastrz. 6 albo 7, **znamienny tym**, że jako katalizator stosuje się mieszaninę siarczanu kobaltu, molibdenianu amonu oraz chlorku lub siarczanu manganu.