

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 549**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2008 E 08788396 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2185142**

54 Título: **Antisépticos**

30 Prioridad:

24.08.2007 GB 0716605

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

05.02.2014

73 Titular/es:

**INSIGHT HEALTH LIMITED (100.0%)
1341 HIGH ROAD
LONDON N20 9HR, GB**

72 Inventor/es:

**WORTHINGTON, TONY y
KARPANEN, TARJA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 549 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

Antisépticos

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a composiciones antisépticas que son particularmente útiles para la antisepsis de la piel.

10 **Antecedentes de la Invención**

La incisión de la piel humana es práctica común en el entorno clínico, por ejemplo durante cirugía, extracción de sangre o inserción de dispositivos intravasculares tales como catéteres. Las infecciones adquiridas en el hospital son complicaciones frecuentes después de la incisión de la piel, particularmente cuando se insertan dispositivos intravasculares, y están asociadas comúnmente con microorganismos de la piel, por ejemplo *Staphylococcus epidermidis* (Richards, *et al.*, 2000; Pfaller *et al.*, 1999; Rupp y Archer 1994).

Varios factores contribuyen al establecimiento de la infección, por ejemplo desinfección inadecuada de la piel antes de la penetración de la piel (Lafforgue, *et al.*, 1997; Traore, *et al.*, 2000; Langgartner, *et al.*, 2004) y la aparición de microorganismos resistentes dentro del escenario clínico, debido a menudo al uso generalizado de agentes antimicrobianos que incluyen antibióticos, antisépticos, y otros biocidas (Koljalq, *et al.*, 2002; Fraise, 2002; Block y Furman, 2002).

Los microorganismos pueden existir como microcolonias en el interior de la piel o como biofilms *in situ* en dispositivos intravasculares, por ejemplo en la superficie de un catéter, y son por tanto más resistentes a concentraciones mayores de antimicrobianos comparados con los microorganismos en suspensión (Rupp y Archer, 1994; Gristina, *et al.*, 1989; Saginur, *et al.*, 2006).

Se conocen muchos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones de la piel. Por ejemplo, es sabido que la clorhexidina tiene una amplia gama de actividad antimicrobiana, con acción rápida, adecuada para preparación de piel antes de procedimientos invasivos tales como inserción de CVC (McDonnell y Russell, 1999).

Se ha demostrado también que algunos aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana con eficacia contra bacterias, levaduras y virus (Cowan, 1999; Karpanen, *et al.*, 2006). Se ha demostrado también que el aceite del árbol del té (TTO) es eficaz en la erradicación de la colonización por MRSA (Al-Shuneigat, *et al.*, 2005; Dryven, *et al.*, 2004; Caelli, *et al.*, 2000) y la reducción de la contaminación microbiana de las manos (Messenger *et al.*, 2005). Otros aceites esenciales que incluyen eucalipto y timol han sido investigados también por sus aplicaciones clínicas potenciales; se ha demostrado que el timol tiene propiedades anti-inflamatorias y aumenta la curación de las heridas en las quemaduras (Dursun, *et al.*, 2003) y se encontró que el eucalipto mejora la curación de las úlceras necróticas (Warnke, *et al.*, 2006).

La combinación de un aceite esencial con digluconato de clorhexidina es conocida. Los efectos antimicrobianos de combinaciones de aceites esenciales con digluconato de clorhexidina contra los patógenos orales *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus plantarum* han sido estudiadas (Flioche, *et al.*, 2005), con vistas al desarrollo de nuevos tratamientos anticaries. US 2006/0105000 describe composiciones para el tratamiento de la piel y las membranas mucosas infectadas que comprenden un agente anti-microbiano y un aceite esencial. El gluconato de clorhexidina ha sido utilizado como el agente anti-microbiano en un elixir bucal para la mucositis, un gel para fisuras anales y un lavado de llagas de presión.

A pesar de la amplia gama de antimicrobianos disponibles, se sabe que numerosos antimicrobianos, con inclusión de clorhexidina, exhiben una permeabilidad deficiente en la piel, por lo que las bacterias más profundas en la piel o por debajo de la superficie de la piel y en los folículos capilares permanecen a menudo inafectadas por los métodos actuales de desinfección de la piel. Por tanto, las infecciones, en particular las que residen en el interior de la piel, siguen siendo un problema, dado que el antimicrobiano no puede atravesar la piel.

Nuevos métodos para suministro de antisépticos de la piel han sido explorados, tales como liposomas, micropartículas y nanopartículas, que podrían proporcionar liberación direccionada y controlada de agentes antimicrobianos (Constant, *et al.*, 2006). Se han estudiado también aceites esenciales como mejoradores de la permeación de la piel (Biruss, *et al.*, 2007; Reichlich, *et al.*, 2006; Fang, *et al.*, 2004). Sin embargo, la eficacia de los aceites esenciales como mejoradores de la permeación es limitada debido a que la capacidad de un aceite esencial para aumentar la permeación a través de la piel es específica del fármaco. Por tanto, persiste una necesidad general

de antimicrobianos mejorados, en particular de métodos y productos para prevenir y tratar las infecciones subcutáneas.

Sumario de la Invención

5 La presente invención está basada en el descubrimiento de que la clorhexidina, cuando se utiliza en combinación con al menos un aceite esencial, exhibe propiedades antimicrobianas y permeación de la piel mejoradas, con un aumento sorprendente en la permeación de la piel. La combinación específica de un aceite esencial y clorhexidina es por tanto útil para la prevención y/o el tratamiento de infecciones dentro de la capa de piel (por ejemplo la dermis), en particular las resultantes de procedimientos médicos invasivos, v.g., la inserción de catéteres.

15 La presente invención está basada también en el descubrimiento de que la clorhexidina, cuando se utiliza en combinación con aceite de eucalipto, exhibe una actividad antimicrobiana sorprendentemente satisfactoria contra *S. epidermidis* y biofilms de *S. epidermidis*. Esta combinación es por tanto útil para la prevención y/o el tratamiento de infecciones de *S. epidermidis*, en particular debidas a procedimientos médicos invasivos, v.g. la inserción de catéteres.

20 De acuerdo con ello, un primer aspecto de la presente invención proporciona el uso de clorhexidina en combinación con un aceite esencial en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección en la piel intacta por debajo del Stratum Corneum.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una combinación de clorhexidina y un aceite esencial para uso en la prevención y/o el tratamiento de una infección en la piel intacta por debajo del Stratum Corneum.

25 Breve descripción de las figuras

La invención se describe con referencia a las figuras siguientes, en las cuales:

30 La figura 1 es un gráfico que muestra la concentración de CHG (μg) extraído de la piel a diversas profundidades después de estudios de permeación de la piel de CHG al 2% (p/v) de aceite de eucalipto en piel humana de espesor total (los resultados están ajustados al peso de la muestra de piel); y

35 La figura 2 ilustra la concentración de CHG (μg) extraído por mg de piel a diversas profundidades de piel humana de espesor total, después de exposición a CHG al 2% (p/v) cuando se combina con IPA al 70% (v/v), con o sin aceite de eucalipto al 10% (v/v), durante 2 minutos (Panel A) y 30 minutos (Panel B), $n = 15$ para todas las condiciones excepto exposición durante 2 minutos a 2% CHG/70% IPA/10% aceite de eucalipto, donde $n = 10$.

Descripción Detallada de la Invención

40 Las preferencias siguientes pueden combinarse unas con otras, en caso apropiado.

Aceite Esencial

45 Los aceites esenciales son conocidos en la técnica y debe asignarse al término "aceite esencial" su significado usual. Para evitación de dudas, los aceites esenciales son mezclas volátiles de terpenos y compuestos oxigenados tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y éteres, que se derivan de material de plantas. Estos se describen, por ejemplo, en Williams, *et al.*, 2004. Los aceites esenciales pueden producirse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica; los métodos más comunes implican destilación, prensado en frío o extracción con disolvente del aceite esencial a partir del material crudo de la planta.

50 En realizaciones de la presente invención que implican el uso de clorhexidina y al menos un aceite esencial, puede utilizarse un solo aceite esencial, o una combinación de aceites esenciales diferentes. En una realización preferida, se utiliza un solo aceite esencial. Muy preferiblemente, este es aceite de eucalipto.

55 Ejemplos de aceites esenciales incluyen, pero sin carácter limitante, aceite de eucalipto, timol, aceite del árbol del té, quenopodio, ylang-ylang, aceite de canelo, aceite de manuka, mentol, aceite de pomelo, aceite de árnica, aceite de hinojo, aceite de geranio, aceite de lavanda, aceite de limón, aceite de hierbabuena, aceite de pino, aceite de menta, aceite de albahaca, y aceite de romero.

60 Preferiblemente, el aceite esencial es timol, aceite de eucalipto o aceite del árbol del té.

Con respecto a las propiedades antimicrobianas, cuando se utiliza en combinación con clorhexidina, el aceite esencial es muy preferiblemente aceite de eucalipto.

La combinación más preferida de acuerdo con la invención es gluconato de clorhexidina (CHG) y aceite de eucalipto.

5 *Clorhexidina*

La clorhexidina (número CAS 55-56-1) es un antiséptico químico que es bien conocido en la técnica. La clorhexidina puede utilizarse en su forma de base libre o en forma de sal. La sal es preferiblemente una sal farmacéuticamente aceptable, varias de las cuales son bien conocidas en la técnica, muy preferiblemente digluconato de clorhexidina (número CAS 18472-51-0), a la que se hace referencia en esta memoria como "CHG".

Infección

15 Se ha encontrado que una combinación de clorhexidina y un aceite esencial es sorprendentemente eficaz en lo que respecta a penetración en la piel, proporcionando con ello un efecto antimicrobiano en el interior de la piel. Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de clorhexidina en combinación con un aceite esencial en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones en la piel. La expresión "en la piel" hace referencia a una infección que no se encuentra en la superficie de la piel, sino que está en el interior del
20 órgano de la piel, es decir por debajo de la capa superficial. La infección puede ser por tanto cualquier forma de infección que ocurra en la piel por debajo de la capa superior de la piel, conocida como el Stratum Corneum.

Preferiblemente, la infección en la piel está causada por uno o más microorganismos que se presentan sobre y en el interior de la piel y que se introducen en las capas más profundas de la piel por debajo del Stratum Corneum por
25 un procedimiento médico invasivo, por ejemplo, por introducción de un catéter en el cuerpo.

Ejemplos de infecciones en la piel que pueden ser direccionadas por (el primer aspecto de) la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, infecciones localizadas en la piel (v.g., infección asociada con inserción de un dispositivo intravascular, por ejemplo catéter venoso central, catéter periférico, catéter PD, derivaciones), acné,
30 forúnculos en la piel, carbunclos, manchas, infecciones de dermatofitas, infección en el sitio de cirugía, úlceras y quemaduras. Preferiblemente, la infección es una asociada con la inserción de un dispositivo intravascular. Estas infecciones pueden originarse en la superficie de la piel, pero pueden extenderse hasta causar daño en las capas más profundas de la piel.

Microorganismos que causan infecciones en la piel, y pueden ser direccionados por la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, cocos Gram-positivos aerobios y anaerobios (por ejemplo estafilococos, estreptococos, enterococos), bacilos Gram-positivos aerobios y anaerobios (por ejemplo clostridios, bacilos, propionibacterias),
35 cocos Gram-negativos aerobios y anaerobios (por ejemplo neisseria, veillonella), cocos Gram-negativos aerobios y anaerobios (por ejemplo, enterobacterias, pseudomónadas, bacteroides), hongos, levaduras y mohos (por ejemplo candida, dermatofitas).

Preferiblemente, la infección en la piel, de acuerdo con el primer aspecto de la invención es una infección por estafilococos. Más preferiblemente, la infección es una causada por *S. epidermidis*.

45 Se ha encontrado también que una combinación de clorhexidina y aceite de eucalipto es sorprendentemente eficaz como agente antimicrobiano contra *S. epidermidis*, específicamente. Por tanto, un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de una combinación de clorhexidina y aceite de eucalipto en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección de *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). *S. epidermidis* es una bacteria Gram-positiva que se presenta frecuentemente sobre y en el interior de la piel de humanos y animales. Varias cepas de *S. epidermidis* forman microcolonias en la piel y biofilms protectores sobre dispositivos tales como catéteres intravenosos. Una combinación de clorhexidina y aceite de eucalipto es eficaz por tanto para prevención y tratamiento de biofilms de *S. epidermidis*. El término "biofilm" es bien conocido en la técnica y debe asignársele su significado usual. Para evitación de dudas, un biofilm es una comunidad estructurada de microorganismos (en este caso, *S. epidermidis*) dentro de una matriz polímera autodesarrollada, sobre una
50 superficie abiótica viva o inerte. Preferiblemente, la superficie es abiótica, tratándose más preferiblemente de una superficie sólida. Muy preferiblemente, la superficie sólida es un catéter, más preferiblemente un catéter intravenoso tal como un Catéter Venoso Central. La prevención o reducción de un biofilm en un catéter evitará o tratará una infección en un paciente que está causada por las bacterias del biofilm.

60 La combinación de clorhexidina y aceite de eucalipto descrita en esta memoria puede utilizarse para prevenir y/o tratar la infección de *S. epidermidis*, poniendo en contacto el *S. epidermidis* con la clorhexidina y el aceite de eucalipto. Preferiblemente, la combinación clorhexidina/aceite de eucalipto se utiliza para prevenir y/o tratar cepas

de *S. epidermidis* encontradas sobre y en el interior de la piel y que puede causar infección. Preferiblemente, la cepa de *S. epidermidis* es una cepa formadora de biofilm, por ejemplo, RP62A. Preferiblemente, la infección causada por *S. epidermidis* es una infección de la piel. Los autores de la presente invención han encontrado que la combinación de clorhexidina y aceite de eucalipto tiene actividad antimicrobiana sinérgica contra biofilms de *S. epidermidis* que es sorprendentemente mejor cuando se compara con las actividades antimicrobianas de clorhexidina y aceite de eucalipto solos.

Una infección de la piel, de acuerdo con cualquiera del primer aspecto o una realización preferida del segundo aspecto de la invención, es una que ocurre en piel que está expuesta para formar la superficie exterior del cuerpo. Esta piel externa no incluye, por ejemplo, membranas internas tales como membranas de la piel o mucosas que pueden existir, por ejemplo, en la boca o los conductos nasales, por ejemplo las membranas bucales, la lengua y las encías. Para evitación de dudas, el término piel no incluye las membranas epiteliales orales.

La piel que está en contacto con una composición de la invención es piel intacta, es decir no agrietada, cortada, hendida, desgarrada, quemada o lesionada de otro modo. Para evitación de dudas, piel intacta se refiere a un Stratum Corneum intacto, es decir donde está sellada la piel. Debe indicarse que la piel que se encuentra en proceso de curación por una herida o corte se considera que está "intacta" una vez que las células de la piel han sellado el lecho de la herida, proporcionando con ello un Stratum Corneum intacto nuevo. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que, cuando se inserta un catéter a través de la piel, la piel crecerá a menudo para sellar el catéter en su lugar. La piel está por tanto sellada y ello está dentro del alcance del término "piel intacta".

Una composición de la invención puede penetrar a través de la capa superior de la piel para tratar o prevenir una infección en el interior de la piel. Por tanto, en una realización preferida, una composición de la invención es para uso tópico externo únicamente.

Las personas expertas comprenderán que la prevención o el tratamiento de una infección en un área, por ejemplo la piel, puede prevenir una infección más grave, o una infección en un área diferente (causada por la infección de la piel). A tales infecciones secundarias se hace referencia a menudo como infecciones adquiridas en hospital, o infecciones nosocomiales. Por ejemplo, la prevención o el tratamiento de una infección localizada tal como una infección de la piel reducirá la probabilidad de que ocurra una infección sistémica. Una infección sistémica común que puede estar causada por una infección localizada inicial es una infección de la sangre, a la que se hace referencia a menudo como envenenamiento de la sangre o septicemia. Por tanto, la prevención de una infección localizada de acuerdo con la invención llevará consigo el beneficio adicional de reducir la incidencia de una infección más grave tal como una infección sistémica. Un ejemplo es la inserción de un catéter en un paciente; una infección inicial es a menudo una infección de la piel, pero a no ser que se trate, esta infección puede volverse rápidamente más grave y puede causar envenenamiento de la sangre. Las composiciones de la presente invención son eficaces para reducir la aparición de estas infecciones secundarias.

Estructura de la piel

La piel tiene dos capas principales, la epidermis y la dermis. El espesor de estas capas varía entre los diferentes sitios del cuerpo.

La epidermis es la capa más externa y la barrera principal para absorción de fármacos. Tiene un espesor aproximado de 50 a 100 μm , del cual el Stratum Corneum (la capa de barrera principal) es aproximadamente 100 μm de espesor. La epidermis no contiene vasos sanguíneos y está constituida principalmente por queratinocitos. Existen cinco capas distintivas: Stratum Corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum, y stratum basale.

La dermis es la capa situada bajo la epidermis y tiene un espesor aproximado de 1000 μm , pero puede variar entre 100 μm y 3000 μm de espesor dependiendo del sitio del cuerpo. La dermis está constituida principalmente por tejido conectivo y contiene sangre, vasos linfáticos y receptores sensoriales. La misma contiene también folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríferas. Existen dos tipos de glándulas productoras de sudor: apocrinas, que se abren al canal del folículo capilar, y ecrinas, que se abren directamente a la superficie de la piel.

Bajo la dermis se encuentra la hipodermis o capa subcutánea que contiene tejido adiposo.

Las combinaciones de clorhexidina y aceite esencial descritas en esta memoria que tienen propiedades satisfactorias de permeación tienen que ser capaces de atravesar el Stratum Corneum, la barrera principal para la permeación antiséptica de la piel, y/o ser capaces de permear al interior de los folículos pilosos. Los folículos pilosos pueden albergar bacterias que no se erradican por los procedimientos corrientes de antisepsis de la piel, y pueden causar infección durante procedimientos invasivos.

Los autores de la presente invención han descubierto que combinaciones de clorhexidina, preferiblemente CHG y al menos un aceite esencial, preferiblemente aceite de eucalipto, exhiben propiedades excelentes de permeación no observadas o estudiadas con anterioridad. De acuerdo con ello, como se ha descrito arriba, el primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de clorhexidina en combinación con al menos un aceite esencial en la fabricación del medicamento para la prevención de una infección de la piel a ciertas profundidades en la capa de piel.

La infección a prevenir y/o tratar de acuerdo con el primer aspecto de la invención ocurre por debajo del Stratum Corneum.

En una realización, la infección a prevenir y/o tratar ocurre a una profundidad de hasta 3000 μm en la capa de piel, preferiblemente a una profundidad de hasta 2000 μm , y más preferiblemente a una profundidad de hasta 1000 μm .

En otra realización, la infección a prevenir y/o tratar ocurre a una profundidad mayor que 100 μm en la capa de piel, preferiblemente a una profundidad mayor que 480 μm .

La infección a prevenir y/o tratar ocurre preferiblemente a una profundidad de entre 100 μm y 3000 μm de la capa de piel. En una realización, la infección a prevenir y/o tratar ocurre a una profundidad comprendida entre 480 μm y 3000 μm de la capa de piel. En una realización, la infección a prevenir y/o tratar ocurre a una profundidad comprendida entre 480 μm y 1000 μm de la capa de piel. Los autores de la presente invención han encontrado adicionalmente que, de modo inesperado, la concentración de CHG de la combinación de CHG y al menos un aceite esencial aumenta con la profundidad creciente más allá de una profundidad de 480 μm en la capa de piel. La permeación de la combinación de CHG y al menos un aceite esencial a una profundidad más allá de 480 μm es sorprendentemente satisfactoria.

En otra realización, la infección a prevenir y/o tratar ocurre en la dermis.

En otra realización, la infección a prevenir y/o tratar ocurre en el folículo piloso.

Combinaciones

En el primer aspecto de la invención puede utilizarse clorhexidina en combinación con cualquier aceite esencial. El aceite esencial puede ser cualquiera de los arriba descritos, preferiblemente timol, aceite de eucalipto, o aceite del árbol del té, y muy preferiblemente aceite de eucalipto. La clorhexidina puede combinarse con cualquier aceite esencial, o con una combinación de diferentes aceites esenciales. En una realización preferida, la clorhexidina está combinada con un solo aceite esencial. Muy preferiblemente, éste es aceite de eucalipto.

En el segundo aspecto de la invención, la clorhexidina se combina específicamente con aceite de eucalipto. En ambos aspectos de la invención, la combinación de clorhexidina con aceite esencial puede combinarse adicionalmente con otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, como se describe más adelante. Un ingrediente adicional preferido es alcohol isopropílico (IPA).

En una realización preferida, la clorhexidina y el aceite esencial, y opcionalmente IPA, son los únicos agentes antimicrobianos que se utilizan, es decir no se requiere ningún otro agente antimicrobiano en una composición de acuerdo con la invención. Preferiblemente, los únicos ingredientes activos, es decir los únicos ingredientes antimicrobianos, en una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención son clorhexidina, un aceite esencial y, opcionalmente, IPA. Análogamente, de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, una realización preferida proporciona una composición en la cual los únicos ingredientes activos, es decir antimicrobianos, son clorhexidina, aceite de eucalipto y, opcionalmente, IPA.

Tratamiento y Prevención

El primer aspecto de la invención proporciona la combinación de clorhexidina y un aceite esencial, preferiblemente aceite de eucalipto, que puede utilizarse en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección en la piel, preferiblemente prevención.

El segundo aspecto de la descripción proporciona el uso de clorhexidina y aceite de eucalipto en la prevención y/o el tratamiento de una infección de *S. epidermidis*.

El término "prevención", como se utiliza en esta memoria en el contexto de la prevención de una infección, se refiere al uso con pacientes que no han desarrollado todavía la afección, pero que se encuentran en riesgo de desarrollar la afección, para prevenir que ocurra una afección. Por ejemplo, la prevención incluye la profilaxis de una infección de

la piel, reducción de la incidencia de infección de la piel, etc. La prevención de la infección incluye también esterilización. Ésta implica preferiblemente aplicación de la combinación de clorhexidina y el aceite esencial a un área de la piel a fin de eliminar microorganismos de dicha área de la piel; en el primer aspecto de la invención, se eliminarán los microorganismos en la piel (por debajo del Stratum Corneum), mientras que en el segundo aspecto de la invención, se eliminará *S. epidermidis*, tanto en el interior de la piel como sobre la misma.

Preferiblemente, la combinación de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la descripción se utiliza antes de cirugía invasiva a fin de prevenir una infección potencial por microorganismos que se encuentran encima de la superficie de la piel, con inclusión de microorganismos presentes en los aparatos quirúrgicos, que se introducen bajo la superficie de la piel durante la cirugía.

El término "tratamiento" como se utiliza en esta memoria en el contexto de tratar una afección, se refiere generalmente a tratamiento y terapia, sea de un humano o un animal (v.g., en aplicaciones veterinarias), en la cual se consigue algún efecto deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, que incluye una reducción en la tasa de progreso, una detención en la tasa de progreso, alivio de los síntomas de la afección, mejora de la afección, y curado de la afección.

Preferiblemente, la combinación de clorhexidina y un aceite esencial se aplica a la superficie exterior de la piel y se deja permear al interior de la capa de piel. Preferiblemente, la combinación de clorhexidina y un aceite esencial permea al interior de la dermis y/o los folículos pilosos. Si la combinación de clorhexidina y un aceite esencial se utiliza para prevenir una infección de la piel en un paciente que está próximo a sufrir un procedimiento médico invasivo, v.g., inserción de un catéter, la combinación debería aplicarse a la piel del paciente antes del procedimiento.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se utiliza en esta memorial, se refiere a aquella cantidad de un compuesto activo, o una forma de material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir cierto efecto terapéutico deseado, con inclusión de prevención, conmensurable con una ratio razonable beneficio/riesgo, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado.

Para evitación de dudas, en una realización de la invención, un método de prevención o tratamiento de una infección en la piel comprende poner en contacto la piel con clorhexidina y un aceite esencial, preferiblemente aceite de eucalipto. En una realización, la clorhexidina y el aceite esencial se aplican simultáneamente. En esta realización, la clorhexidina y el aceite de eucalipto pueden aplicarse en el interior o sobre un material tejido o no tejido. Por ejemplo, un apósito, esponja, vendaje, emplasto o material similar, que comprende a la vez la clorhexidina y el aceite esencial, puede utilizarse para prevenir o tratar una infección de la piel. Preferiblemente, la composición se aplica utilizando un dispositivo aplicador. Un dispositivo aplicador adecuado comprende típicamente medios para retener la composición (hasta que se desea la aplicación) y medios para aplicar la composición a la piel. El medio para retener la composición es preferiblemente un receptáculo tal como un tubo o ampolla. El medio para aplicar la composición a la piel es preferiblemente una esponja, más preferiblemente una esponja de espuma. Dispositivos aplicadores adecuados están disponibles comercialmente de Insight Health Limited, Reino Unido.

En una descripción alternativa, la clorhexidina y el aceite esencial se aplican secuencialmente. Con preferencia, cuando se aplican secuencialmente, se aplica la clorhexidina a la piel y subsiguientemente se aplica el aceite esencial. En esta descripción, el aceite esencial se aplica preferiblemente por medio de un material que comprende el aceite esencial, por ejemplo un parche tejido o no tejido, tal como un apósito, esponja, vendaje, emplasto o similar. Puede utilizarse un dispositivo aplicador, como se ha descrito arriba, para aplicar la clorhexidina y/o el aceite esencial.

El segundo aspecto de la descripción se refiere al uso de clorhexidina y aceite de eucalipto como un biocida contra *S. epidermidis*. Una realización preferida comprende un material tejido o no tejido, por ejemplo una esponja, toalla, toallita, gasa, paño o similar, que comprende clorhexidina y aceite de eucalipto. Este material puede utilizarse para poner en contacto el *S. epidermidis* con la clorhexidina y el aceite de eucalipto y proporcionar el efecto biocida. Preferiblemente, el material tejido o no tejido es una gasa de superficie dura, más preferiblemente una gasa de superficie dura tejida.

Dosificación

Será apreciado por un experto en la técnica que las dosis apropiadas de los componentes clorhexidina y aceite esencial pueden variar de un paciente a otro. La determinación de la dosificación óptima implicará generalmente el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico contra cualquier riesgo de efectos secundarios deletéreos. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores que incluyen, pero sin carácter limitante, la actividad de la composición particular, la ruta de administración, la tasa de excreción del compuesto, la duración del

tratamiento, otros fármacos, compuestos, y/o materiales utilizados en combinación, la gravedad de la afección, y la especie, sexo, edad, peso, condición, estado general de salud, e historia médica previa del paciente. La cantidad de los compuestos y la ruta de administración estarán finalmente a discreción del médico, veterinario, o clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para alcanzar concentraciones locales en el sitio de acción que consigan el efecto deseado sin causar daño sustancial o efectos secundarios deletéreos.

La administración puede efectuarse en una sola dosis, continua o intermitente (v.g., en dosis divididas a intervalos apropiados) a todo lo largo del curso del tratamiento o la prevención. Los métodos de determinación de los medios más eficaces y la dosificación de la administración son bien conocidos para los expertos en la técnica y variarán con la formulación utilizada para terapia, el propósito de la terapia, la infección diana que se esté tratando, y el individuo a tratar. Pueden realizarse administraciones simples o múltiples, siendo seleccionados el nivel y patrón de dosis por el médico, veterinario o clínico que dirija el tratamiento.

La combinación de clorhexidina y aceite esencial se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad de clorhexidina, preferiblemente CHG, está comprendida preferiblemente en el intervalo que va desde 0,1% a 5% en peso (p/v), más preferiblemente 0,5% a 4% en peso, todavía más preferiblemente 0,5% a 2,5% en peso, y muy preferiblemente 2% en peso. La cantidad del aceite esencial está comprendida preferiblemente en el intervalo que va desde 5% a 60% en volumen (v/v) de la composición, más preferiblemente 10% a 50% en volumen, todavía más preferiblemente 10% a 30% en volumen, y muy preferiblemente 10% a 16% en volumen, por ejemplo 10% en volumen. Experimentos realizados han indicado que 10% (v/v) de aceite de eucalipto es comparable a 50% (v/v) de aceite de eucalipto en la capacidad de mejorar el suministro de CHG a través de la piel. Una dosis adecuada de la combinación de clorhexidina y aceite esencial es preferiblemente 2% en peso de clorhexidina y 50% en volumen de aceite esencial, más preferiblemente 2% en peso de clorhexidina y 30% en volumen de aceite esencial, y preferiblemente 2% en peso de clorhexidina y 10% o 16% en volumen de aceite esencial.

Cuando se utiliza digluconato de clorhexidina en forma de sal, éster, amida, profármaco, o análogo, la cantidad administrada se calcula sobre la base del compuesto parental y por tanto el peso real a utilizar se incrementa proporcionalmente.

De acuerdo con esta exposición, los componentes de la combinación pueden añadirse de modo simultáneo o secuencialmente. En una realización, la combinación de compuestos se aplica en una sola formulación. Una composición preferida de una sola formulación comprende CHG, aceite de eucalipto y alcohol isopropílico.

En una realización separada, la clorhexidina y el aceite esencial se administran por separado. Más preferiblemente, la clorhexidina se aplica directamente a la piel y un material que comprende un aceite esencial se pone luego en contacto con la piel recubierta de clorhexidina. El material que comprende el aceite esencial puede ser tejido o no tejido, por ejemplo un parche, emplasto, vendaje o apósito. Opcionalmente se puede añadir alcohol isopropílico a la piel antes, después, o simultáneamente con la clorhexidina.

Para evitación de dudas, un método de prevención o tratamiento de una infección de acuerdo con cualquier aspecto de la descripción comprende poner en contacto la piel de un paciente con una combinación de clorhexidina y un aceite esencial. La puesta en contacto de la piel con la clorhexidina y el aceite esencial tratará o prevendrá una infección, como se detalla en esta memoria. En una realización, la piel se pone en contacto simultáneamente con la clorhexidina y el aceite esencial, preferiblemente aceite de eucalipto. Más preferiblemente, se aplica una sola formulación que comprende la clorhexidina y el aceite esencial. En una realización separada, el método de prevención o tratamiento de la infección comprende poner en contacto la piel de un paciente con clorhexidina y, por separado, poner en contacto la piel recubierta de clorhexidina con el aceite esencial, preferiblemente aceite de eucalipto. En esta realización, la clorhexidina se aplica preferiblemente a la piel en forma líquida y el aceite esencial se aplica preferiblemente sobre un material tejido o no tejido que comprende el aceite esencial, por ejemplo un parche, emplasto, vendaje o apósito de herida. Una aplicación en dos etapas de clorhexidina seguida por aceite esencial es por consiguiente una realización preferida de la invención.

Formulaciones

Si bien es posible que la combinación de clorhexidina y aceite esencial se administre sola, es preferible presentarla como una formulación farmacéutica (v.g., composición, preparación, medicamento) que comprende al menos la combinación de clorhexidina con al menos un aceite esencial, como se ha definido arriba, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables distintos bien conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin carácter limitante, portadores, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizadores, solubilizadores, agentes tensioactivos (v.g., agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes saborizantes, y agentes edulcorantes farmacéuticamente

aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos como por ejemplo otros agentes terapéuticos o profilácticos.

5 Un agente activo preferido para inclusión en una composición de acuerdo con el primer y el segundo aspectos de la invención es alcohol isopropílico (nombre IUPAC: propan-2-ol). Una composición muy preferida comprende por tanto, y opcionalmente está constituida en esencia sólo por CHG, aceite de eucalipto y alcohol isopropílico. El IPA puede estar presente a cualquier nivel eficaz, es decir, a cualquier nivel que sea eficaz como antimicrobiano. Una cantidad preferida es 50% a 90% (v/v), más preferiblemente 60% a 80% (v/v) y muy preferiblemente 70% (v/v) de IPA en la composición. Una composición preferida comprende por tanto 2% (p/v) CHG, 70% (v/v) IPA y 10% (v/v) 10 aceite de eucalipto. Una composición que comprende alcohol isopropílico es particularmente ventajosa dado que proporciona un efecto antimicrobiano de acción rápida (debido al alcohol isopropílico) y un efecto antimicrobiano prolongado y sostenido (debido a la clorhexidina y el aceite esencial). Se ha encontrado que esta combinación es eficaz; esto es particularmente sorprendente, dado que previamente se había sugerido que el alcohol isopropílico inhibe la permeación de la clorhexidina, en particular CHG, en la piel. El autor de la presente invención ha 15 encontrado que la presencia de un aceite esencial, en particular aceite de eucalipto, anula esta inhibición de la penetración, como se detalle en los Ejemplos y la figura 2.

20 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en esta memoria, se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance de un criterio médico sano, adecuados para uso en contacto con los tejidos del individuo en cuestión (v.g., humano) sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica excesivas, u otro problema o complicación, conmensurable con una ratio razonable beneficio/riesgo. Cada portador, diluyente, excipiente, etc., tiene que ser también "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

25 Portadores, diluyentes, excipientes, etc. adecuados pueden encontrarse en textos farmacéuticos estándar, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994.

30 Las formulaciones se pueden preparar por cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen el paso de poner en asociación el compuesto activo con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el compuesto activo con portadores (v.g., portadores líquidos, portadores sólidos finamente divididos, etc.), seguido por conformación del producto, en caso necesario.

35 La formulación se puede preparar para proporcionar liberación rápida o lenta; liberación inmediata, retardada, temporizada, o sostenida; o una combinación de las mismas.

40 Una formulación de acuerdo con la invención es preferiblemente una formulación tópica. Las formulaciones pueden encontrarse adecuadamente en forma de líquidos, soluciones (v.g., acuosas, no acuosas), suspensiones (v.g., acuosas, no acuosas), emulsiones (v.g., de aceite en agua, de agua en aceite), geles, pastas, ungüentos, cremas, lociones, aceites, espumas, sprays, nebulizaciones o aerosoles. Preferiblemente, la formulación es una emulsión. Más preferiblemente, la formulación es una emulsión y se suministra en una sola formulación.

45 Las formulaciones pueden proporcionarse adecuadamente como parche, emplastro adhesivo, vendaje, apósito, o análogo que está impregnado con uno o más compuestos activos y opcionalmente uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables distintos, que incluyen, por ejemplo, mejoradores de la penetración, permeación, y absorción distintos de un aceite esencial. Las formulaciones pueden proporcionarse también adecuadamente en la forma de un depósito o reservorio. Preferiblemente, la clorhexidina se aplica a la piel tópicamente, seguida por un material, preferiblemente un parche y más preferiblemente un parche biológico, que comprende el al menos un 50 aceite esencial.

La combinación de clorhexidina y aceite esencial puede disolverse en, suspenderse en, o mezclarse con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables distintos.

55 Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica incluyen geles, pastas, ungüentos, cremas, lociones, y aceites, así como parches, emplastos adhesivos, vendajes, apósitos, depósitos, y reservorios.

Los ungüentos se preparan típicamente a partir de la combinación de clorhexidina y aceite esencial y una base de ungüento parafínica o miscible con el agua.

60 Las cremas se preparan típicamente a partir de la combinación de clorhexidina y aceite esencial y una base de crema de aceite en agua. En caso deseado, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al

menos aproximadamente 30% p/p de un alcohol polivalente, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejora la absorción o penetración del compuesto activo a través de la piel u otras áreas afectadas, distinto de un aceite esencial. Ejemplos de tales mejoradores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y compuestos afines análogos.

Las emulsiones se preparan típicamente a partir de clorhexidina, preferiblemente CHG, y una fase aceitosa, que puede comprender opcionalmente un simple emulsionante (conocido de otro modo como emulgente), o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o aceite o con una grasa y un aceite a la vez. Preferiblemente, la fase aceitosa comprende al menos un aceite esencial. Preferiblemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizador. Se prefiere también incluir a la vez un aceite y una grasa. Juntos, el o los emulsionantes con o sin estabilizador(es) constituyen la denominada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y/o la grasa constituyen la denominada base de ungüento emulsionante, que forma la fase aceitosa dispersada de las formulaciones de crema.

Emulgentes y estabilizadores de emulsión adecuados incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetosteárico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio. La elección de aceites o grasas adecuados para la formulación está basada en la consecución de las propiedades cosméticas deseadas, dado que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites que se utilizarán probablemente en las formulaciones de emulsión farmacéuticas puede ser muy baja. Así, la crema debería ser preferiblemente un producto no grasiento, sin mancha y lavable con consistencia adecuada para evitar la fuga de los tubos u otros recipientes. Pueden utilizarse alquil-ésteres mono- o dibásicos de cadena lineal o ramificada tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, propilenglicol-diésteres de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo preferidos los tres últimos ésteres. Éstos pueden utilizarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, pueden utilizarse lípidos de punto de fusión elevado tales como parafina blanda blanca y/o aceite de parafina u otros aceites minerales.

La invención se describirá a continuación con los ejemplos no limitantes siguientes.

Ejemplos Biológicos

(1) Estudios antimicrobianos

Organismo y preparación del biofilm bacteriano

Se utilizó *S. epidermidis* RP62A por su capacidad para producir un biofilm (Sadovskaya, *et al.*, 2005). Las bacterias se almacenaron en cuentas (MicroBank, Pro-Lab Diagnostics, Cheshire, Reino Unido) a -70°C hasta que fueron necesarias. La capacidad de la cepa para producir limo se confirmó por cultivo de las bacterias en agar de Rojo Congo (Freeman, *et al.*, 1989). Para producir los biofilms microbianos, las cepas se inocularon primeramente en agar Muller-Hinton (MHA) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y se incubaron al aire a 37°C durante 18-20 horas. Se suspendieron diez colonias de la placa de cultivo en solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS, Sigma, Dorset, Reino Unido). La concentración de bacterias se ajustó a 1×10^8 cfu (unidades formadoras de colonias)/ml por dilución del cultivo con PBS estéril y medición de la DO a 570 nm (se realizaron curvas de calibración para cfu de *S. epidermidis* contra la DO a 570 nm antes del estudio, datos no presentados). La suspensión se diluyó ulteriormente con caldo Muller-Hinton (MHB) suplementado con 2% (p/v) de glucosa (Fisher Scientific Leicester, Reino Unido) para obtener inóculos que contenían 1×10^5 cfu/ml. Se distribuyeron 200 µl de la suspensión de bacterias en partes alícuotas en pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos con paredes blancas y fondo claro, tratadas con cultivo de tejido (Corning Incorporated, NY, EE.UU.). Los pocillos en la última columna de la placa servían como control, y contenían 200 µl de MHB suplementado con 2% (p/v) de glucosa solo. Las placas de microtitulación se incubaron en el aire a 37°C durante 48 horas.

Preparación del inóculo de test para evaluación de la eficacia antimicrobiana por ensayo en suspensión

Se prepararon inóculos de test para el ensayo en suspensión suspendiendo 10 colonias de *S. epidermidis* RP62A a partir de un cultivo nocturno sobre MHA en PBS estéril. La concentración de bacterias se ajustó a 1×10^8 cfu/ml por dilución del cultivo con PBS estéril y medición de la DO a 570 nm (se realizaron curvas de calibración para cfu de *S. epidermidis* contra DO a 570 nm, antes del estudio, datos no presentados). La suspensión se diluyó ulteriormente con MHB para obtener inóculos que contenían 1×10^7 cfu/ml para ensayos de sinergia o 1×10^6 cfu/ml para testado de la actividad antimicrobiana de CHG y aceites solos en suspensión.

Preparación de los agentes antimicrobianos

Se diluyeron digluconato de clorhexidina acuoso (CHG), aceite del árbol del té (TTO), aceite de eucalipto (EO) y timol (todos ellos de Sigma-Aldrich) con MHB para obtener una solución stock de 512 mg/ml para los aceites esenciales y 512 µg/ml para CHG. Se añadió 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a los stock esenciales para mejorar la solubilidad de los aceites en la suspensión.

Curva de calibración para bioluminiscencia de ATP y recuento de colonias bacterianas

Antes de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana, se construyó una curva estándar para unidades relativas de luz (RLU) frente a cfu/ml bacterianas. Se cultivó *S. epidermidis* con MHB suplementado con 2% (p/v) de glucosa en una placa de microtitulación de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente para obtener biofilms de bacterias. Los pocillos de la placa de microtitulación con biofilms bacterianos establecidos se lavaron 3 veces con PBS estéril y se retiraron los biofilms de los pocillos utilizando un método de "raspado y lavado" (Adams, 2006). Resumidamente, se llenó cada pocillo con 200 µl de PBS estéril y, con una punta de pipeta estéril, se raspó la pared de cada pocillo aproximadamente 10 veces y se raspó el fondo en dirección horizontal, vertical y transversal 10 veces en cada dirección. La suspensión se retiró y se recogió en un tubo Eppendorf estéril y el procedimiento se repitió 4 veces más para obtener un volumen final de 1000 µl por tubo. El procedimiento se realizó por separado sobre 3 pocillos. Las suspensiones se mezclaron por agitación energética y se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril. Se distribuyeron 100 µl de la suspensión neta y diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} en partes alícuotas sobre pocillos de una placa de microtitulación de paredes blancas y fondo claro. Se añadieron 100 microlitros de Bactolyse a cada pocillo. La placa se dejó flotar luego en un sonicador de baño acuoso, y se trató luego por ultrasonidos a 50 Hz durante 30 minutos para lisar las células y liberar el ATP bacteriano. Se añadieron 20 µl de luciferasa a cada pocillo y se leyó la luminiscencia mediante un luminómetro. Las cfu bacterianas en cada suspensión y dilución se comprobaron por el método de recuento de gotas. Los resultados se expresaron como cfu contra RLU.

Actividad antimicrobiana de TTO, EO, timol y CHG contra *S. epidermidis* en suspensión

Se determinaron la concentración inhibidora mínima (MIC) y la concentración bacteriana mínima (MBC) de CHG, TTO, EO y timol acuosos por ensayo de dilución en microcaldo (NCCLS, 1997). De modo resumido, los agentes antimicrobianos se distribuyeron en partes alícuotas en la primera columna en placas de microtitulación de 96 pocillos claras y de fondo redondo (Serowell Bibby-Sterlin, Staffordshire, Reino Unido) y se realizaron diluciones dobles seriadas con MHB en las columnas sucesivas. La última columna servía como control que contenía MHB y no contenía agente antimicrobiano alguno. La actividad antimicrobiana de 5% (v/v) a 0,6% (v/v) de DMSO se testó en placas de microtitulación separadas a todo lo largo del ensayo. Se inocularon todos los pocillos con 100 µl de suspensión de *S. epidermidis* que contenía 1×10^6 cfu/ml, y las placas se incubaron al aire a 37°C durante 20 horas. Se determinaron las concentraciones bactericidas mínimas por retirada de la suspensión de los pocillos claros en MHA, se aplicaron con un aplicador estéril y las placas se incubaron al aire a 37°C durante 18-20 horas. El ensayo se realizó por triplicado.

Actividad antimicrobiana de CHG, TTO, DO y timol contra el biofilm de *S. epidermidis*

Placas de microtitulación que contenían biofilm de *S. epidermidis* RP62A se lavaron una sola vez con PBS estéril para retirar cualesquiera bacterias no fijadas. Los agentes antimicrobianos se diluyeron con MHB para obtener concentraciones de CHG de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml, y concentraciones de aceite esencial de 256 mg/ml a 0,5 mg/ml. Se añadieron a los pocillos 250 microlitros del compuesto antimicrobiano por triplicado. Las columnas 11 y 12 servían como controles con biofilm con solución salina sola y pocillos claros con MHB solo sin biofilm bacteriano. La actividad antimicrobiana de 5% (v/v) DMSO contra el biofilm bacteriano se testó a todo lo largo del test en una placa separada. Después de la incubación de los biofilms bacterianos con agente antimicrobiano a 37°C en aire durante 20 horas, se lavaron los pocillos una sola vez con PBS estéril y se determinó la destrucción de los microbios por bioluminiscencia de ATP (ViaLight MDA Bioassay Kit, Cambrex, Berkshire, Reino Unido); resumidamente, se añadieron 100 µl de Bactolyse (ViaLight MDA) con 100 µl de solución salina en cada pocillo y las placas se trataron por ultrasonidos a 50 Hz durante 30 minutos para liberar y lisar las células en el biofilm bacteriano. Se añadieron a cada pocillo 50 µl de reactivo de monitorización de ATP (ViaLight MDA Bioassay Kit) y se midió la luminiscencia. El ensayo se realizó por duplicado.

Susceptibilidad antimicrobiana de TTO, EO y timol en combinación con CHG contra la suspensión de *S. epidermidis*

La actividad antimicrobiana de TTO, EO y timol en combinación con CHG acuosa se evaluó en un ensayo de suspensión por el método del tablero de ajedrez (Shin y Lim, 2004). Resumidamente, se prepararon diluciones dobles seriadas de los compuestos antimicrobianos (128 mg/ml a 1 mg/ml para los aceites esenciales y 64 µg/ml a

0,15 µg/ml para CHG). Se pipetearon 50 microlitros de las diluciones de CHG en las columnas de una placa de microtitulación de 96 pocillos en concentraciones decrecientes y se distribuyeron en partes alícuotas 50 microlitros del aceite esencial en las filas en concentración decreciente. Los pocillos se inocularon luego con 10 µl de suspensión bacteriana que contenía 10⁵ cfu. Las columnas 10, 11 y 12 servían como controles que contenían caldo nutriente e inóculo solo, y compuestos antimicrobianos separadamente con el inóculo, respectivamente. Las placas de microtitulación se incubaron al aire a 37°C durante 24 horas y las placas se inspeccionaron respecto a crecimiento microbiano a fin de determinar la MIC de los compuestos solos y en combinación. Para determinar la actividad sinérgica o antagonista de las combinaciones antimicrobianas, se determinó la concentración inhibidora fraccionada (FIC) y el índice FIC (FICI) utilizando las fórmulas:

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC mínima de la combinación de agentes antimicrobianos}}{\text{MIC del agente antimicrobiano solo}}$$

$$\text{FICI} = \text{FIC de ACEITE} + \text{FIC de CHG}$$

Los valores FICI inferiores a 0,5 se consideraron como efecto sinérgico, los valores entre 0,5 y 4,0 como efecto indiferente, y los valores superiores a 4,0 como actividad antagonista. El ensayo se realizó por duplicado.

Susceptibilidad antimicrobiana de TTO, OE y timol en combinación con CHG contra biofilm de *S. epidermidis*

Se lavaron placas de microtitulación que contenían biofilm de *S. epidermidis* RP62A una sola vez con PBS estéril para eliminar cualesquiera bacterias no fijadas. Los agentes antimicrobianos se diluyeron con MHB como se ha descrito arriba y se distribuyeron en partes alícuotas 125 µl de cada una de las diluciones en pocillos de placas de microtitulación en concentraciones decrecientes como en el ensayo de tablero de ajedrez descrito anteriormente, con un volumen total de 250 µl por pocillo para asegurar que los biofilms bacterianos se cubrían por completo. Las columnas 10, 11 y 12 servían como controles y contenían compuestos antimicrobianos solos, y biofilm solo con solución salina. Las placas se incubaron luego al aire a 37°C durante 24 horas, después de lo cual los pocillos se vaciaron y los valores FIC y FICI se determinaron por bioluminiscencia de ATP como se ha descrito previamente. El ensayo se realizó por duplicado.

Resultados

Se confirmó que *S. epidermidis* RP62A era la cepa productora de limo por producción de colonias características negras con bordes duros en agar de Rojo Congo. Después de 48 horas de incubación de *S. epidermidis* RP62A en MHB suplementado con 2% (p/v) de glucosa, el biofilm bacteriano en cada pocillo contenía un promedio de 5,53 x 10⁶ cfu.

Las concentraciones inhibitoras mínimas para CHG eran 2 veces, para aceite del árbol del té 3 veces y para aceite de eucalipto 5 veces mayores contra las bacterias que crecían en biofilm (MIC 8 µg/ml, 16 mg/ml y 128 mg/ml, respectivamente) comparadas con las células planctónicas (MIC 2 µg/ml, 2 mg/ml, y 4 mg/ml, respectivamente). Los valores MIC de timol eran 2 veces menores contra los biofilms comparados con las células planctónicas (4 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente). El biofilm bacteriano era erradicado por CHG y los 3 aceites esenciales, con concentración erradicante de MBC/biofilm de CHG, timol, TTO y eucalipto 32 µg/ml, 2 mg/ml, 64 mg/ml, y 256 mg/ml, respectivamente (Tablas 1 y 2).

Se ha encontrado que la combinación de CHG con TTO, aceite de eucalipto o timol no interfiere con la actividad antimicrobiana de CHG o el aceite. Adicionalmente, se ha encontrado que CHG combinado con EO mejoraba sinérgicamente su actividad contra *S. epidermidis* que crecía en biofilm (Tabla 2). Adicionalmente, las concentraciones de TTO y CHG requeridas para inhibir el crecimiento de biofilm se reducían en dos veces y una vez respectivamente, cuando se utilizaron en combinación (16 mg/ml a 4 mg/ml de TTO, 8 µg/ml, a 4 µg/ml de CHG), pero el timol en combinación con CHG no afectaba a las concentraciones requeridas para inhibir el crecimiento bacteriano en biofilm o suspensión (TTO 0,5 mg/ml y CHG 8 µg/ml). Cinco por ciento de DMSO (v/v), que se utilizó como emulsionante en suspensiones de aceite, no exhibía actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis* en biofilm o suspensión.

La Tabla 1 y la Tabla 2 exhiben la actividad antimicrobiana del aceite de eucalipto, el aceite del árbol del té y timol en combinación con digluconato de clorhexidina acuoso contra *S. epidermidis* RP62A que crecía en suspensión y en biofilm.

Tabla 1: Suspensión

Combinación de suspensión	MIC de aceite (mg/ml) en combinación/ solo	FIC del aceite	MIC de CHG ($\mu\text{g/ml}$) en combinación/ solo	FIC de CHG	FICI	Resultado
CHG+ Eucalipto	4/4	1	2/2	1	2	Indiferencia
CHG+ Aceite del árbol del té	2/2	1	2/2	1	2	Indiferencia
CHG+ Timol	1/4	0,25	2/2	1	1,25	Indiferencia

Tabla 2: Biofilm

5

Combinación de biofilm	MIC de aceite (mg/ml) en combinación/ solo	FIC del aceite	MIC de CHG ($\mu\text{g/ml}$) en combinación/ solo	FIC de CHG	FICI	Resultado
CHG+ Eucalipto	4/32	0,125	0,25/8	0,03125	0,15625	Sinergia
CHG +Aceite del árbol del té	4/16	0,25	4/8	0,5	0,75	Indiferencia
CHG+ Timol	0,5/0,5	1	8/8	1	2	Indiferencia

(2) Estudios de Permeación de la Piel - CHG + Aceite de Eucalipto

10 **Muestras de piel humana**

Se obtuvieron muestras de piel humana de espesor total de pacientes sometidas a cirugía de reducción de mama (The Stephen Kirby Skin Bank, Queen Mary's Hospital, Londres, Reino Unido). Antes del estudio, se obtuvo aprobación total del estudio por el comité ético y consentimiento escrito de las pacientes donantes del tejido. La piel humana de espesor total se congeló el día de escisión y se guardó a -70°C hasta el día de la investigación.

Celdas de difusión de Franz.

Se utilizaron para los estudios de permeación de la piel celdas de difusión verticales (celdas de difusión de Franz) con un área media de superficie de difusión de $1,65\text{ cm}^2$. Se utilizó como fluido receptor solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se dejó durante una noche en un compartimento receptor (aproximadamente 29 ml de volumen) con camisa de agua circulante a 37°C . El día de la investigación, la piel escindida se descongeló en PBS y se cortó al tamaño requerido para ajustarse a las celdas de difusión de Franz (2,9 centímetros de anchura de círculo). Las muestras de piel se montaron en celdas de difusión de Franz y se dejaron durante una hora en las celdas de difusión para alcanzar el equilibrio con el fluido receptor antes de comenzar el estudio.

Agentes antimicrobianos

Se preparó solución de digluconato de clorhexidina (CHG) al 2% (p/v) por dilución del CHG al 20% (p/v) con agua destilada estéril y 0,001% (v/v) de Tween 80. Se preparó una suspensión de aceite de eucalipto con CHG por dilución de los agentes con agua destilada para obtener una concentración final de aceite de eucalipto al 50% (v/v), 2% (p/v) de CHG y 0,001% (v/v) de Tween 80.

Estudios de permeación de la piel

Se distribuyó en partes alícuotas 1 mililitro de solución en CHG de suspensión CHG/aceite de eucalipto por triplicado en la superficie de la piel humana escindida del compartimiento donante en celdas de difusión de Franz. La temperatura se mantuvo constante por medio de una camisa de agua circulante ajustada a 37°C, y el fluido receptor se agitó continuamente mediante una varilla de agitación magnética. Los fluidos receptores se muestrearon por extracción de 1 ml del fluido cada 10 minutos durante la primera hora, cada 30 minutos durante las 7 horas siguientes y después de 12 y 24 horas. Los fluidos receptores se repusieron después de cada muestra. Las muestras se filtraron y se analizaron por HPLC.

Sección de las muestras de piel

Las pieles humanas escindidas se retiraron de las celdas de difusión de Franz después de los estudios de permeación de la piel y se lavaron con PBS. Las pieles se secaron con toallas de papel, se cortaron en círculos de muestra de 0,5 cm de ancho y por triplicado, se congelaron y se guardaron a -70°C hasta investigaciones ulteriores. Las muestras de piel congeladas se dividieron en secciones de 20 µm de superficie de piel hasta 600 µm de profundidad y secciones de 30 µm desde 600 µm a 1050 µm de profundidad utilizando un microtomo.

Análisis de CHG en las capas de piel

Se utilizó la solución de la fase móvil para análisis por HPLC como medio de extracción de CHG de las capas de piel. Se pusieron cada una de las secciones de piel de 20 µm o 30 µm en tubos Eppendorf por separado y se determinó el peso de las secciones de piel por pesada de los tubos antes y después de la adición de la muestra de piel. La CHG se extrajo de las muestras de piel por división en partes alícuotas de 1 ml del medio de extracción en los tubos con sección de piel y se calentó en baño de agua a 60°C durante 1 hora, se mezcló por agitación energética y se centrifugó durante 10 minutos a 6000 g. Las muestras se filtraron y se analizaron por HPLC.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se analizó cuantitativamente digluconato de clorhexidina por HPLC. La solución de fase móvil para análisis HPLC contenía 75:25 metanol:agua bidestilada, heptanosulfonato de sodio 0,005 M, 0,1% (v/v) dietilamina y se ajustó a pH 4 con ácido acético glacial. Las muestras se filtraron y se analizaron por HPLC (Agilent 1100) con columna Hypersil ODS-2 (tamaño de partícula 5 µ) (Thermo Electron Corporation, Reino Unido) con un caudal de 1,2 ml/min, y longitud de onda del detector 254 nm.

Resultados

Después de 24 horas de estudios de permeación de piel de 2% (p/v) CHG con o sin 50% (v/v) aceite de eucalipto, y utilizando piel humana de espesor total, no exhibían niveles detectables de CHG en el fluido receptor. El aceite de eucalipto penetraba más profundamente en la piel y a mayores concentraciones, comparado con CHG sola (figura 1).

Más allá de una profundidad de aproximadamente 480 µm de la capa de piel, la figura 1 muestra un aumento sorprendente en la concentración de CHG con la profundidad creciente hasta una profundidad de piel de aproximadamente 1000 µm cuando se utilizaba en combinación con aceite de eucalipto.

Permeación de la piel de CHG con aceite de eucalipto y alcohol

La finalidad de este estudio fue evaluar la permeación de la piel de CHG y la retención de CHG a las profundidades crecientes de piel humana escindida después de exposición a 2% (p/v) CHG en 70% (v/v) IPA y en combinación con aceite de eucalipto ("EO").

Materiales

Productos químicos

Heptano-sulfonato de sodio, dietilamina (ambos de grado HPLC), solución salina tamponada con fosfato (PBS), CHG acuoso al 20% (p/v), aceite de eucalipto (EO) (cineol de 82,9%) y alcohol isopropílico (IPA) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Dorset, Reino Unido). Metanol y ácido acético glacial (ambos de grado HPLC) se adquirieron de Fisher Scientific (Leicestershire, Reino Unido).

Equipo

Se adquirió Agilent 1200 series High Performance Liquid Chromatography (HPLC) de Agilent Technologies (Reino Unido) y la columna cromatográfica de fase inversa Hypersil CPS-2 (150 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μ) de Thermo Electron Corporation (Reino Unido). El criotomo se adquirió de Bright Instruments (Cambs, Reino Unido).

Muestras de piel

Se obtuvieron muestras de piel humana de espesor total de pacientes sometidas a cirugía de reducción de mama (The Stephen Kirby Skin Bank, Queen Mary's Hospital, Londres, Reino Unido) y se obtuvo aprobación total del comité ético antes de este estudio (REC 2002/169). La piel humana de espesor total se congeló el día de la escisión y se guardó a -70°C hasta que fue necesaria.

Métodos**Permeación de la piel de CHG con EO e IPA**

Se realizaron estudios de permeación de la piel con celdas verticales de difusión de Franz. El compartimento receptor se llenó con 29 ml de PBS, se mantuvo a 37°C con una camisa de agua circulante y se agitó por removido con una barra magnética. Las muestras de piel se descongelaron en PBS a la temperatura ambiente, se secaron con una toalla absorbente y se montaron en celdas de difusión de Franz con el Stratum Corneum (SC) hacia arriba orientado al compartimento donante. El área de la superficie expuesta al compuesto de test era 3,14 cm² (2 cm de diámetro). Todo el aire atrapado se retiró entre la piel y el fluido receptor y se dejó que la piel alcanzara el equilibrio durante 30 min hasta alcanzar la temperatura de la superficie de la piel de 32°C.

Se diluyó CHG acuoso al 20% (p/v) con agua destilada, IPA y EO para obtener las concentraciones finales de 2% (p/v) CHG en 70% (v/v) IPA y 2% (p/v) CHG con 5%, 10%, 20% y 50% (v/v) EO. Se añadió Tween 80 [0,1% (v/v)] a las soluciones de test para mejorar la solubilidad de EO en el vehículo. Se aplicó 1 mililitro de solución de test sobre la superficie de la piel en el compartimento donante y se selló el compartimento con un film resistente a la humedad a fin de prevenir la evaporación. Se retiró 1 mililitro de fluido receptor cada 30 min durante 2 horas, cada hora entre las 2 y las 6 horas y a las 8 horas, 12 horas y 24 horas. El fluido retirado del compartimento receptor se reemplazó inmediatamente con un volumen igual de solución reciente de PBS. Todas las muestras se filtraron a través de un filtro de nailon de 0,45 μ m (Kinesis, Reino Unido) y se analizaron por HPLC. El ensayo se realizó por triplicado.

Cuantificación de CHG por HPLC

Las muestras se pasaron a la temperatura ambiente a través de una columna cromatográfica de fase inversa (Hypersil CPS-2) a un caudal de 1,2 ml/min durante 9 min, con detección ultravioleta a 254 nm. La fase móvil isocrática estaba constituida por una mezcla metanol:agua (75:25) con heptanosulfonato de sodio 0,005 M y dietilamina al 0,1% (v/v) ajustada a pH 4 con ácido acético glacial. (Se validó el método para cuantificación de CHG por HPLC y los niveles de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se determinaron antes del estudio - datos no presentados).

Estudios del perfil de penetración de CHG con EO e IPA

Las muestras escindidas de piel humana de espesor total montadas en las celdas de difusión de Franz se expusieron a 2% (p/v) CHG en 70% (v/v) IPA y 2% (p/v) CHG con 50% (v/v) EO (ambos con 0,1% (v/v) Tween 80) durante 2 min, 30 min y 24 h. Se evaluaron CHG al 2% (p/v) con 20%, 10% y 5% (v/v) EO con 0,1% (p/v) Tween 80 respecto a penetración de CHG después de 24 horas de exposición. Después de la exposición, se retiraron las muestras de piel, se lavaron con PBS y se secaron con una toalla absorbente. Las muestras de piel se pulverizaron inmediatamente con un CryoSpray (Bright Instruments) y se congelaron a -20°C. Se cortaron biopsias de punzón (7 mm de diámetro) por triplicado de cada muestra congelada y se pusieron sobre un disco de corcho en composición de imbibición (Bright Instruments, Cambs, Reino Unido). Las muestras congeladas se seccionaron horizontalmente con un microtomo (Bright Instruments) en secciones de 20 μ m (desde la superficie hasta una profundidad de 600 μ m) y 30 μ m (profundidades de 600 a 1500 μ m). Cada sección se puso en un tubo Eppendorf y se determinó el peso total de cada muestra de piel. Se extrajo la clorhexidina de la piel por distribución de partes alícuotas de 1 ml de la solución de fase móvil (75% metanol, 25% agua destilada, 0,1% heptano-sulfato de sodio, 0,1% dietilamina, pH 4) en muestras de piel y se incubó en baño de agua a 60°C durante 1 hora. Las muestras se mezclaron por agitación enérgica y se filtraron antes del análisis por HPLC. Los resultados se calcularon como μ g de CHG por mg de piel. Se analizó una piel de control (piel sin tratamiento) paralelamente a las muestras de test. El ensayo se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron por un test t de Student utilizando software INSTAT3 (versión del software Graph Pad 3.06) con un nivel de significación $p < 0,05$.

5

Resultados**Estudios de permeación de la piel**

- 10 La clorhexidina no se detectaba en el compartimiento receptor (LOD 0,0157 $\mu\text{g/ml}$) durante el estudio de permeación de 24 horas cuando se utilizó piel de dos donantes. Se detectaron niveles insignificantes de CHG (menores que 0,0016% de la dosis aplicada) durante los estudios de permeación sobre piel de un tercer donante después de 24 horas de exposición a 2% (p/v) CHG en 70% (v/v) IPA y 2% (p/v) CHG con 50% (v/v) EO.

15 Estudios del perfil de penetración de la piel de CHG

Penetración de la piel de CHG después de exposición durante 2 min y 30 min

- 20 La cantidad de CHG que atravesaba y se retenía en la piel era significativamente mayor después de tratamiento con CHG en combinación con 50% (p/v) EO comparada con CHG en solución acuosa o CHG con 70% (v/v) IPA; después de 2 min de exposición había una diferencia significativa en las concentraciones medias de CHG a los niveles más profundos de la piel cuando se expusieron a CHG con 50% (v/v) EO comparada con CHG acuosa (profundidades de 300 a 1500 μm ; $p < 0,05$) con una concentración media de CHG (y SEM) en el interior de los tejidos a esta profundidad de 0,0270 $\mu\text{g/mg}$ ($\pm 0,0021$ $\mu\text{g/mg}$) de tejido después de antisepsis combinada con
- 25 CHG/EO y 0,0048 $\mu\text{g/mg}$ ($\pm 0,0008$ $\mu\text{g/mg}$) de tejido después de antisepsis con CHG solo. Las diferencias entre CHG/EO y CHG en 70% (v/v) IPA eran significativas para todas las profundidades de la piel con una concentración media de CHG (y SEM) en los 100 μm superiores de 0,1167 ($\pm 0,0313$) y 0,0226 ($\pm 0,007$) para CHG/EO y CHG/IPA respectivamente.

- 30 A los 30 min, las concentraciones de CHG para todas las profundidades de la piel eran significativamente mayores ($p < 0,05$) con CHG/EO comparadas con CHG solo o CHG/IPA; a las profundidades de 300 μm a 1500 μm , la concentración de CHG aumentaba $> 9,5$ veces entre CHG/EO y CHG o CHG/IPA, con una concentración media de CHG (y SEM) de 0,0190 ($\pm 0,0015$) $\mu\text{g/mg}$ de tejido, 0,0021 ($\pm 0,0004$) $\mu\text{g/mm}$ de tejido y 0,0022 $\mu\text{g/mg}$ ($\pm 0,0018$) de tejido para CHG/EO, CHG y CHG/IPA, respectivamente. En las capas superiores (0-300 μm) las concentraciones
- 35 medias de CHG eran 4,8 a 6,4 veces mayores con CHG/EO comparadas con CHG solo y 2,7 a 20 veces mayores con CHG/EO comparadas con CHG/IPA.

Penetración de la piel de CHG después de 24 horas de exposición

- 40 La concentración de CHG extraído de todas las capas de la piel (0-1500 μm) era significativamente mayor en presencia de 50% (v/v) EO comparada con CHG solo después de 24 horas de permeación ($p < 0,05$). La capa de 100 μm superior tenía un aumento > 2 veces (7,880 μg a 16,841 μg por mg de tejido para tratamientos con CHG y CHG/EO respectivamente) en la concentración de CHG y la diferencia aumentaba > 5 veces en las capas más profundas de la piel a profundidades de 300 a 1500 μm [0,581 ($\pm 0,0466$) μg a 3,123 ($\pm 0,16470$) μg por mg de tejido para CHG y CHG/EO respectivamente]. Los datos de este estudio de retención se obtuvieron por agrupación de los
- 45 datos de cinco secciones de piel consecutivas de 20 μm y 30 μm (es decir secciones de 100 μm desde arriba hasta 600 μm de profundidad y secciones de 150 μm desde 600 a 1500 μm de profundidad).

Penetración de la piel de CHG después de 24 horas de exposición a IPA y diversas concentraciones de EO

- 50 Se evaluó la concentración óptima de EO que mejora la penetración de CHG en la piel. Cinco por ciento (v/v) EO hacía posible una penetración de CHG en la piel significativamente mayor en las capas más profundas de la piel (por debajo de 300 μm $p < 0,05$), y 10% (v/v) de EO mejoraba significativamente la penetración de CHG en la piel ($p < 0,05$) dentro de los 900 μm superiores comparado con CHG solo. No había diferencias significativas ($p > 0,05$) en la penetración de la piel de CHG por 2% (p/v) CHG acuoso y 2% (p/v) CHG con 70% (v/v) IPA.
- 55

- La concentración óptima de EO, que mejoraba la penetración de CHG en la piel humana de espesor total, se evaluó ulteriormente en combinación con 2% (p/v) en CHG en 70% (v/v) IPA. Diez por ciento (v/v) EO en comparación con 2% (p/v) CHG en 70% (v/v) IPA demostraba una penetración mejorada de CHG en la piel después de 2 min y 30 min
- 60 de exposición comparada con 2% (p/v) CHG/70% (v/v) IPA solo ($p < 0,05$; figura 2).

Referencias

Las referencias siguientes que conciernen a lo anterior se incorporan todas ellas en esta memoria por referencia.

Adams, D.H., *An evaluation of three strategies to reduce device related infection associated with hypodermic needles and peripheral vascular catheters*, 2006, PhD thesis, Aston University.

Al-Shuneigat, J., Cox, S.D., Markham, J.L., Effects of a topical essential oil containing formulation on biofilm-forming coagulase-negative staphylococci, *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41, 52-55.

Biruss, B., Kählig, H., Valenta, C., Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 328, 142-151.

Block, C., Furman, M., Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment, *Journal of Hospital Infection*, 2002, 51, 201-206.

Caelli, M., Porteous, J., Carson, C.F., Heller, R., Riley, T.V., Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Hospital Infection*, 2000, 46, 236-237.

Constant, H., Falson, F., Pirot, F., Current and new strategies for the delivery of antiseptic agents, *Current Drug delivery*, 2006, 3(3), 315-323.

Cowan, M.M., Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12, 564-582.

Dryden, M.S., Dailly, S., Crouch, M., A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization, *Journal of Hospital Infection*, 2004, 56, 283-286.

Dursun, N., Liman, N., Ozyazgan I., Gunes, I., Saraymen, R., Role of thymus oil in burn healing, *Journal of Burn Care Rehabilitation*, 2003, 24 (6), 395-399.

Elliott, T.S., Moss, H.A., Tebbs, S.E., Wilson, I.C., Bonser, R.S., Graham, T.R., Burke, L.P., Faroqui, M.H., Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters, *European Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 16, 210-213.

Fang, J., Leu, Y.L., Hwang, T.L., Cheng, H.C., Essential oils from sweet basil (*Ocimum basilicum*) as novel enhancers to accelerate transdermal drug delivery, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27, 1819-1825.

Filоче, S.K., Soma, K., Sissons, C.H., Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate, *Oral Microbiology and Immunology*, 2005, 20, 221-225.

Fraise, A.P., Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides, *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92, Suppl 158S-162S (Review).

Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci, *Journal of Clinical Pathology*, 1989, 42 (8), 872-874.

Gristina, A.G., Jennings, R.A., Naylor, P.T., Myrvik, Q.N., Webb, L.X., Comparative In Vitro Antibiotic Resistance of Surface-Colonizing Coagulase-Negative Staphylococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1989, 33, 813-816.

Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994.

Karpanen, T.J., Worthington, T., Conway, B., Lambert, P.A., 2006 (POSTER).

Köljalq, S., Naaber, P. and Mikelsaarm M., Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility, *Journal of Hospital Infection*, 2002, 51, 106-113.

Lafforgue, C., Carret, L., Falson, F., Reverdy, M.E., Freney, J., Percutaneous absorption of a chlorhexidine digluconate solution, *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, 147, 243-246.

Langgartner, K., Linde, H.J., Lehn, N., Reng, M., Schölmerich, J., Glück, T., Combined skin disinfection with chlorhexidine/propanol and aqueous povidone-iodine reduces bacteria colonisation of central venous catheters. *Intensive Care Medicine*, 2004, 30, 1081-1088.

McDonnell, G., Russell, A.D., Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12, 147-179.

Messenger, S., Hammer, K.A., Carson, S.F., Riley, T.V., Effectiveness of hand-cleansing formulations containing tea tree oil assessed ex vivo on human skin and in *in vivo* with volunteers using European Standard EN1499, *Journal of Hospital Infection*, 2005, 59, 220-228.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, (6th edition), Approved Standard, M2-A6, Wayne PA, 1997.

Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.D., Kugler, K.C., Beach, M.L., Survey of blood stream infections attributed to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, SENTRY Participants Group, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999, 33, 283-297.

Reichling, J., Landvatter, U., Wagner, H., Kostka, K-H, Schaefer, U.F., In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, 64, 222-228.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States, *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 2000, 21, 510-515.

Rupp, M.E., Archer, G.L., Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress, *Clinical Infectious Diseases*, 1994, 19, 231-243.

Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., Jabbouri, S., Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A, *Infection and Immunity*, 2005, 73 (5), 3007-317.

Saginur, R., St. Denis, M., Ferris, M., Aaron, S.D., Chan, F., Lee, C., Ramotar, K., Multiple Combination Bactericidal Testing of Staphylococcal Biofilms from Implant-Associated Infections, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50, 55-61.

Shin, S., Lim, S., Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp, *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97, 1289 - 1296.

Traoré, O., Allaert, F.A., Fournet-Fayard, S., Verrière, J.L., Laveran, H., Comparison of in-vivo antibacterial activity of two skin disinfection procedures for insertion of peripheral vascular catheters: povidone iodine versus chlorhexidine, *Journal of Hospital Infection*, 2000, 44, 147-150.

Walsh, S.E., Maillard, J.Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E., Charbonneau, D.L., Bartolo, R.G., Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility, *Journal of Hospital Infection*, 2003, 55, 98-107.

Warnke, P.H., Sherry, E., Russo, P.A.J., Acil, Y., Willtfang, J., Sivananthan, S., Sprengel, M., Roldan, J.C., Schubert, S., Bredee, J.P., Springer, I.N.G., Antibacterial essential oils in malodorous cancer patients: Clinical observations in 30 patients, *Phytomedicine*, 2006, 13, 463-467.

Williams, A.C., Barry, B.W., Penetration Enhancers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 603-618

REIVINDICACIONES

1. Uso de clorhexidina en combinación con un aceite esencial en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infección en piel intacta por debajo del Stratum Corneum.
5
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la clorhexidina es digluconato de clorhexidina.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el medicamento comprende alcohol isopropílico.
10
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la infección es de *S. epidermidis*.
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para prevención y/o tratamiento de una infección de la piel a la profundidad de hasta 1000 µm en la capa de piel.
15
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para prevención y/o tratamiento de una infección de la piel a una profundidad mayor que 100 µm en la capa de piel.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, para prevención y/o tratamiento de una infección de la piel a una profundidad superior a 480 µm en la capa de piel.
20
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para prevención y/o tratamiento de una infección de la piel a una profundidad comprendida entre 100 y 3000 µm en la capa de piel.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, para prevención y/o tratamiento de una infección de la piel a una profundidad comprendida entre 480 y 1000 µm en la capa de piel.
25
10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para prevención y/o tratamiento de una infección de la dermis.
30
11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para prevención y/o tratamiento de una infección de un folículo piloso.
12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el aceite esencial es aceite de eucalipto.
35
13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el aceite esencial es timol.
14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el aceite esencial es aceite del árbol del té.
40
15. Una composición que comprende clorhexidina y un aceite esencial para uso en la prevención y/o el tratamiento de una infección en piel intacta por debajo del Stratum Corneum.
- 45 16. La composición de la reivindicación 15, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

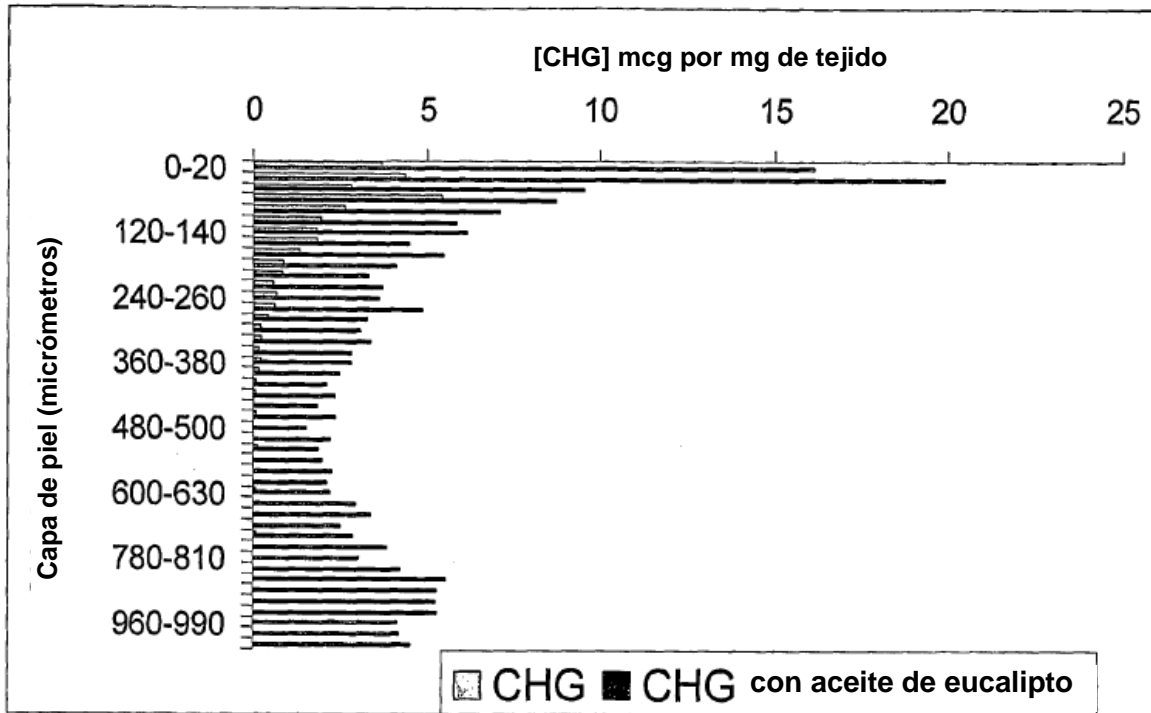
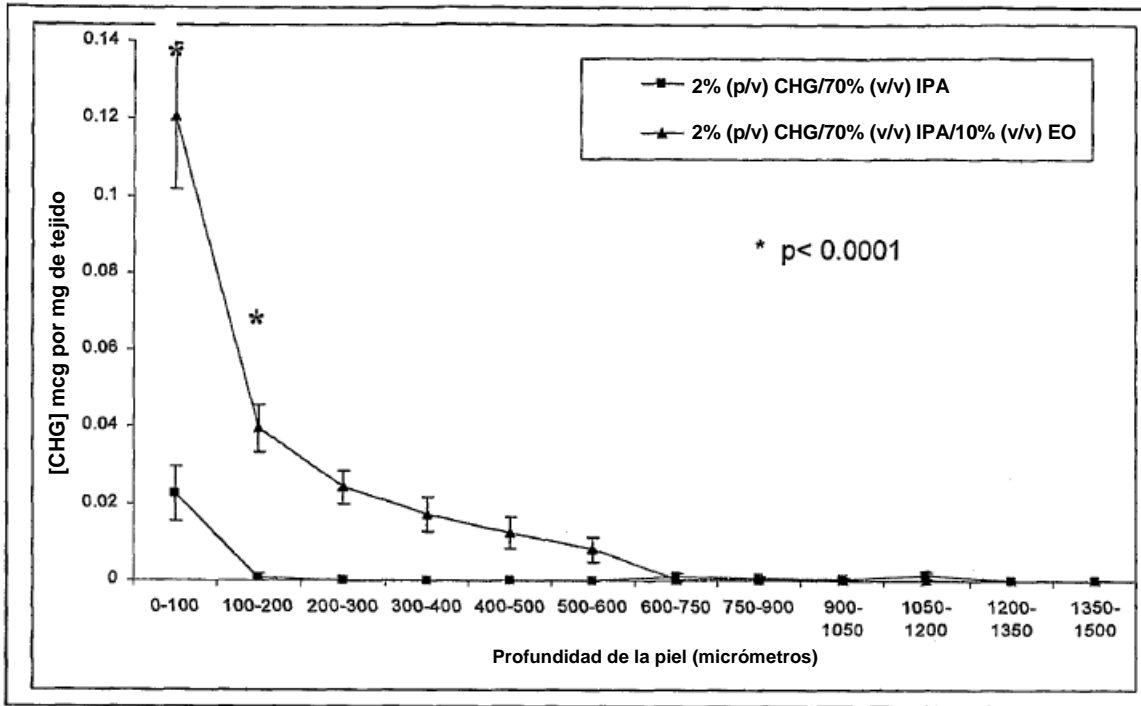
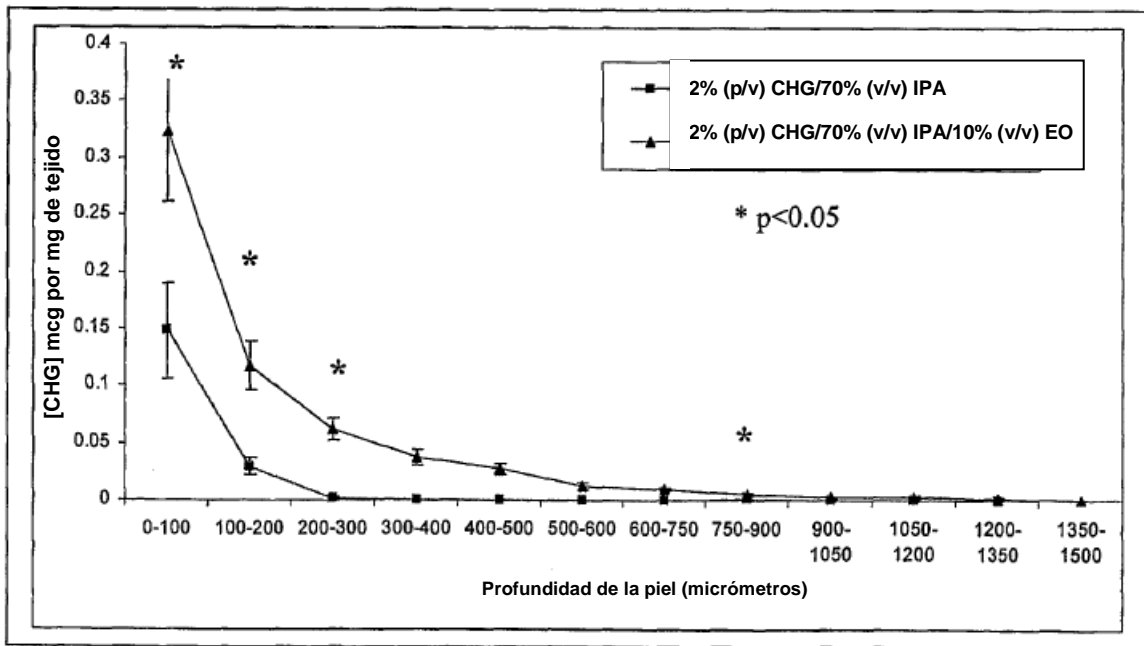


Figura 1



A



B

Figura 2