

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 132**

51 Int. Cl.:

A61K 33/14 (2006.01)

A61K 33/40 (2006.01)

A01N 59/08 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008 E 08743577 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2200441**

54 Título: **Composición y procedimiento de prevención de una enfermedad oral**

30 Prioridad:

09.07.2007 US 774730

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**MICROPURE, INC. (100.0%)
16100 N. Greenway-hayden Loop, F-400
Scottsdale, AZ 85260, US**

72 Inventor/es:

**RATCLIFF, JAMES L.;
DRAKE, DAVID R.;
CUNNINGHAM, SALLY A.;
RENKEN, ELIZABETH A. y
YOUNG, ELENA J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 132 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición y procedimiento de prevención de una enfermedad oral

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al uso de una composición para la prevención y el tratamiento de enfermedades orales y la reducción de olores bucales con el uso del dióxido de cloro (ClO₂) estabilizado, tal como se define en las reivindicaciones.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 La placa dental se ha definido recientemente como “una comunidad diversa de microorganismos que se encuentran sobre la superficie del diente en forma de una biopelícula, sumergida en una matriz extracelular de polímeros del hospedante y de origen microbiano” (Marsh, 2004). Las biopelículas de la placa dental aparecen por encima y por debajo de la línea de las encías, supragingival y subgingival, respectivamente. Las placas supragingivales productoras de ácidos son la causa de la caries dental. Las placas que se forman sobre las superficies subgingivales del diente, y que revisten el recubrimiento epitelial del surco gingival, conducen al desarrollo de infecciones periodontales (es decir, gingivitis y periodontitis) (Rose *et al.*, 2004).

- 15 La placa dental supragingival se forma sobre los dientes en unas horas después de que hayan sido limpiados. Las proteínas salivares, tales como mucinas, proteínas ricas en prolina, estaherinas, histatinas y cistatinas, tienen una fuerte afinidad por el mineral hidroxiapatito (HAP) de los dientes. Estas proteínas se unen con rapidez al HAP del diente para formar un revestimiento espeso, denominado la película adquirida. Ciertas bacterias en la cavidad oral se adhieren selectivamente a la película, empiezan a dividirse y a formar colonias. En un primer momento, aproximadamente 80% de las bacterias que colonizan las superficies del diente revestidas con la película son cocos facultativos gram-positivos no móviles, tales como *Streptococcus (sanguis) sanguinis* (patente de EEUU 4.889.714). El otro 20% incluye una diversidad de bacterias gram-negativas, tales como especies de *Veillonella*. A medida que las colonias crecen, el entorno cambia debido a las actividades metabólicas de estos colonizadores tempranos y a la adición de diversos grupos de bacterias diferentes a la masa de la biopelícula (placa). Un importante cambio ambiental en la biopelícula de la placa es la disminución del potencial de oxidación-reducción local, con lo cual se crea un entorno con un bajo contenido en oxígeno que estimula la colonización y el crecimiento de bacterias anaerobias. Los microorganismos en la biopelícula sintetizan una matriz lodosa o glicocáliz a partir de los abundantes polisacáridos, glicoproteínas y azúcares de la dieta (por ejemplo, sacarosa) presentes en el entorno oral. En último término, la placa se convierte en una biopelícula característica con una población microbiana diversa muy estructurada y sumergida en una matriz, en la que la expresión génica está muy alterada (Marsh, 2005).

- 20 Las bacterias en las biopelículas de la placa dental son la causa principal de varias enfermedades orales que incluyen gingivitis, periodontitis crónica y agresiva, y enfermedades periodontales necrotizantes. La mayoría de las infecciones orales son lesiones superficiales provocadas por los residentes normales de la microbiota oral y/o por patógenos exógenos que colonizan la cavidad oral. Estas infecciones incluyen, pero no se limitan a caries dental, gingivitis, periodontitis, lesiones endodónticas, e infecciones sistémicas que pueden tener manifestaciones orales, tales como tuberculosis y sífilis.

- 25 Debido a la asociación entre las biopelículas de la placa y las enfermedades orales, sería muy necesaria una formulación que inhiba la formación de la placa bacteriana frenando la velocidad de recrecimiento de las bacterias de la placa (patógenos gram-negativos y gram-positivos) y reduciendo la presencia de organismos en cultivos mixtos o en un caldo de cultivo, tales como, pero sin limitarse a *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas (Peptostreptococcus) micros*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Campylobacter rectus*, y *Enterococcus faecalis*.

- 30 La gingivitis es la inflamación de los tejidos conectivos gingivales alrededor de los dientes provocada por la placa dental (Rose *et al.*, 2004). Desde el punto de vista clínico se caracteriza por las señales clásicas de inflamación, tales como enrojecimiento (rubor), hinchamiento (tumor), y temperatura elevada del tejido (calor). Además, el tejido afectado sangra cuando se toca suavemente. La gingivitis puede evitarse mediante un cuidado oral continuado, pero si no se trata puede conducir a una enfermedad grave de las encías denominada periodontitis. La periodontitis también está provocada por la placa dental y se caracteriza por la inflamación y la infección de los tejidos que soportan a los dientes (es decir, tejido conectivo y hueso). Si no se trata conduce a la pérdida del diente. Es una enfermedad inflamatoria inducida por la placa del periodontio que conduce a una mayor profundidad de sondaje y a la destrucción del ligamento periodontal y del hueso alveolar de soporte adyacente.

La halitosis, o mal olor oral, está provocada por compuestos de azufre volátiles producidos por la degradación metabólica bacteriana implicada con la degradación de sustancias orgánicas en la cavidad oral. Las bacterias en la saliva, la placa y los revestimientos de la lengua producen compuestos de azufre volátiles (VSC), que incluyen sulfuro de hidrógeno (H₂S), metilmercaptano (CH₃SH), y dimetilmercaptano (CH₃SH), que son los principales contribuyentes al mal olor oral (Loesche y Kazor, 2002). Las bacterias orales, que incluyen los anaerobios gram-negativos que se encuentran en la placa subgingival, producen diversos compuestos de mal olor, que incluyen VSC y ácidos orgánicos, tales como el ácido butírico, la putrescina, el ácido valérico y el eskatol (Kazor *et al.*, 2003). De forma más específica, estudios *in vitro* han demostrado que las especies bacterianas asociadas con la placa subgingival producen grandes cantidades de CH₃SH y H₂S. Estas bacterias incluyen *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* (anteriormente *Bacteroides forsythus*), *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, y especies de *Eubacterium* (Loesche y Kazor 2002; Kazor *et al.*, 2003). La presente invención emplea dióxido de cloro estabilizado como bactericida, que conduce a la reducción de las bacterias orales y, fundamentalmente, a un menor mal olor oral. Se ha sugerido que las composiciones de la técnica anterior de productos para el cuidado oral de dióxido de cloro estabilizado reducen el mal olor actuando como agente desodorante (patentes de EEUU n.ºs 4689215, 4696811, 4786492, 4788053, 4792442, 4793989, 4808389, 4818519, 4837009, 4851213, 4855135, 4886657, 4889714, 4925656, 4975285, 5200171, 5348734, 5489435, 5618550).

Se está estableciendo una relación entre la enfermedad periodontal y la salud sistémica, con crecientes pruebas científicas. Se ha demostrado que la enfermedad oral está asociada con enfermedades sistémicas, tales como enfermedad cardiovascular (aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, ictus), diabetes, parto prematuro, y bajo peso al nacer (Kim y Amar, 2006).

Los trastornos crónicos que incluyen enfermedad periodontal, aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria y diabetes, comparten una característica de respuesta inflamatoria exacerbada. Una mayor producción de citoquinas proinflamatorias acompaña a la respuesta exacerbada, que aparece en respuesta a la exposición microbiana (Rose *et al.*, 2004). Sin embargo, la respuesta inflamatoria puede dañar al tejido sano en cualquier parte del cuerpo.

Las infecciones periodontales estimulan al cuerpo para que segregue interleuquinas y citoquinas derivadas de monocitos como parte del sistema de defensa inmunológico innato contra la exposición microbiana. Las bacterias gram-negativas presentes en las infecciones periodontales y la placa dental liberan lipopolisacáridos (endotoxinas) que inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias. Las infecciones periodontales pueden contribuir directamente a la enfermedad cardiovascular (por ejemplo, aterosclerosis y trastornos tromboembólicos) mediante la estimulación del sistema inmunológico para que produzca citoquinas proinflamatorias (Beck *et al.*, 1996).

Se ha demostrado la enfermedad periodontal y su papel en la inflamación sistémica en investigaciones para identificar bacterias patógenas orales, que incluyen *A. actinomycetemcomitans*, y en ateromas en arterias carótidas (Padilla *et al.*, 2006). Las pruebas ofrecidas por Michaud *et al.* (2007) sugieren que los hombres con enfermedad periodontal tienen un riesgo 63% mayor de desarrollar cáncer pancreático. La asociación de la enfermedad periodontal con la inflamación crónica y el cáncer pancreático necesita de más investigación para confirmar su relación.

Hay pruebas que indican que existe un efecto de la enfermedad periodontal sobre el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular, que es una de las principales causas de muerte en EEUU. La aterosclerosis es una enfermedad de los vasos sanguíneos en la que las células endoteliales que tapizan los vasos se lesionan. Las lesiones endoteliales pueden ser provocadas por una amplia diversidad de estímulos perjudiciales, que incluyen hipertensión, tabaquismo, hiperlipidemia, toxinas, virus, reacciones inmunológicas y bacterias. En respuesta a las lesiones endoteliales, la pared interna (íntima) de la pared del vaso se engrosa. Las áreas engrosadas se denominan ateromas (o placas ateromatosas) y contienen lípidos, colesterol y ácidos grasos, rodeados por una cápsula fibrosa. La presencia de una placa ateromatosa aumenta el riesgo de trombosis o estenosis que conduce a una disminución del flujo sanguíneo y al infarto de miocardio (ataque al corazón).

La conexión más importante entre enfermedad cardíaca y enfermedad periodontal es la inflamación. La enfermedad periodontal es uno de los trastornos inflamatorios crónicos más comunes del cuerpo. La inflamación aparece como un mecanismo de defensa contra bacterias que colonizan el cuerpo. Durante el desarrollo de las infecciones periodontales, mediadores inflamatorios y bacterias entran en la corriente sanguínea y viajan hacia otras partes del cuerpo, tales como el corazón.

Briggs *et al.* (2006) han mostrado que la enfermedad cardíaca coronaria está asociada con una mala salud periodontal en hombres de mediana edad. Este estudio mide los niveles séricos de proteína C reactiva (CPR) que se produce en el hígado en respuesta a un ataque bacteriano. La CRP es un marcador no específico de la inflamación y está asociada con un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular. El estudio descubrió que los hombres con periodontitis tienen mayores niveles séricos de CRP que los individuos sin

periodontitis.

También se ha demostrado que las infecciones periodontales son un factor de riesgo independiente para el ictus isquémico (Grau *et al.*, 2004). Estos investigadores descubrieron que el riesgo de isquemia cerebral era 4,3 veces mayor en personas con periodontitis graves, comparado con aquellas con periodontitis suave o sin periodontitis.

- 5 Se ha demostrado que *Porphyromonas gingivalis*, un importante patógeno periodontal, tiene mayor prevalencia de las placas ateroscleróticas que otras bacterias (Ford *et al.*, 2005 y 2007). Otras bacterias que el estudio de Ford *et al.* encontró a unos niveles significativamente mayores en las arterias incluyen *Fusobacterium nucleatum*
10 *Fusobacterium nucleatum* y *Tannerella forsythia* (2005). Estos estudios demuestran que los patógenos periodontales desempeñan un papel en el desarrollo de la aterosclerosis, así como el hecho de que la respuesta
15 inmunológica a múltiples patógenos parece ser muy compleja (Ford *et al.*, 2007). Los estreptococos, tales como *Streptococcus sanguinis*, son componentes habituales de la placa dental procedente de sitios sanos. Sin embargo, pueden provocar problemas sistémicos cuando entran en la corriente sanguínea. Herzberg y Meyer (1998) han demostrado que cuando *S. sanguinis* se introduce en la corriente sanguínea de conejos, los animales desarrollan trombos potencialmente mortales (coágulos sanguíneos) en el sistema circulatorio. Sin embargo, el efecto de la enfermedad periodontal sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares continúa siendo un área de investigación y son necesarios más estudios para establecer una relación de causa-efecto entre los dos.

- 20 Las enfermedades periodontales están surgiendo como un nuevo factor de riesgo para el parto prematuro y el bajo peso al nacer. Pueden tener tanto impacto sobre estas complicaciones como el tabaco, el alcohol, el uso de fármacos y las infecciones del tracto genitourinario. Se ha investigado la relación entre las infecciones periodontales y el parto prematuro y el bajo peso al nacer, y se ha visto que las mujeres con periodontitis tienen un mayor riesgo de resultados adversos del embarazo (Offenbacher *et al.*, 2001; Madianos *et al.*, 2001). El mecanismo que explica los efectos de la periodontitis sobre el nacimiento prematuro sugiere que durante el embarazo entran en la cavidad uterina microbios, incluyendo lipopolisacáridos (endotoxinas), y estimulan la producción de citoquinas (inflamación). La producción de mediadores proinflamatorios conduce a la síntesis de
25 prostaglandinas, que contraen los músculos uterinos, dilatan el cuello uterino, y provocan la ruptura prematura de las membranas (Rose *et al.*, 2004).

- Buduneli *et al.* (2005) descubrieron que las siguientes bacterias subgingivales, *Peptostreptococcus micros* y *Campylobacter rectus*, desempeñan un papel en el aumento del riesgo de bajo peso al nacer prematuro. La exposición a las bacterias orales provoca la inflamación y la infección fetal, que aumenta aún más el riesgo de parto prematuro (Boggess *et al.*, 2005; Offenbacher *et al.*, 2005). También se ha descubierto que *Fusobacterium nucleatum*, un anaerobio oral gram-negativo, está asociado con resultados adversos del embarazo por la colonización de las paredes de la placenta (Han *et al.*, 2004). Deben establecerse más estudios sobre la relación entre enfermedad periodontal y parto prematuro y bajo peso al nacer para desarrollar una asociación estadísticamente significativa (Bassani *et al.*, 2007).

- 35 La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas en las que se produce una hiperglucemia (azúcar sanguíneo elevado) debido a problemas con la actividad de la insulina o su secreción. La diabetes mellitus de tipo 1 es debida a la destrucción de las células beta productoras de insulina en el páncreas. Las células beta pueden ser destruidas por un ataque ambiental, tal como ciertas infecciones víricas o reacciones autoinmunitarias. Existe una susceptibilidad genética a la enfermedad y principalmente aparece en individuos con ascendencia noreuropea. La diabetes mellitus de tipo 2 es debida a un agotamiento de las células beta pancreáticas. Existe una marcada resistencia a la insulina en tejidos periféricos. En último término, la hiperglucemia crónica provoca que el páncreas ya no pueda producir insulina. La obesidad es un factor ambiental extremadamente importante que aumenta en gran medida el riesgo de desarrollar la diabetes de tipo 2. Existe una relación bidireccional entre la diabetes y la enfermedad periodontal. La diabetes aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad periodontal debido a la respuesta comprometida a infecciones bacterianas (García *et al.*, 2001). Los neutrófilos (leucocitos) están funcionalmente alterados en los diabéticos con poco control metabólico. La enfermedad periodontal también se reconoce como un riesgo para exacerbar trastornos diabéticos.

- La diabetes y la enfermedad periodontal están conectadas por la relación de la inflamación y la resistencia a la insulina que resulta de una infección. La inflamación conduce a una mayor producción de citoquinas, síntesis de proteínas, y resistencia a la insulina (Kim y Amar, 2006). Ciertos estudios han sugerido que los sujetos diabéticos presentan una respuesta exagerada cuando se exponen a bacterias, comparado con sujetos sin diabetes (Nishimura *et al.*, 2007).

- El control metabólico de la diabetes está alterado en pacientes con infecciones periodontales sin tratar. Lim *et al.* (2007) han investigado la relación entre el control glucémico y la salud periodontal, y han descubierto que un bajo control glucémico está muy asociado con la presencia de una enfermedad periodontal. La prevención de la enfermedad periodontal en pacientes diabéticos es importante para reducir el riesgo de desarrollar otras

complicaciones diabéticas, tales como nefropatía, infarto de miocardio e ictus (Nishimura *et al.*, 2007). Serían necesarios más estudios para demostrar la importancia de los trastornos periodontales sobre la diabetes mellitus y todos los demás trastornos sistémicos.

Las especies bacterianas que se encuentran habitualmente en biopelículas y que se considera que son patógenos periodontales en personas susceptibles incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (Holt y Ebersole, 2005). La coagregación de bacterias o la adherencia entre células de los microorganismos es una característica básica de las biopelículas de placas dentales. La coagregación de las bacterias en las biopelículas de la placa no es un acontecimiento aleatorio, y las bacterias tienden a colonizar los dientes como grupos o en complejos. Para objetivos de análisis, a estos complejos se les han asignado denominaciones de colores para reflejar la etapas del desarrollo de la formación de la biopelícula y la asociación de ciertos complejos bacterianos con infecciones periodontales (Socransky *et al.*, 1998). Los cuatro grupos denominados complejos azul, amarillo, verde y morado están compuestos por colonizadores tempranos del nicho subgingival. Los colonizadores tardíos asociados con complejas comunidades microbianas de biopelículas subgingivales maduras se denominan complejos naranja y rojo (Rose *et al.*, 2004). El complejo amarillo incluye varios estreptococos, tales como *S. sanguinis* y *S. oralis*. El complejo morado consiste en *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula*. Estas especies son colonizadores tempranos y están entre las primeras en unirse a la superficie del diente. Crean un entorno que facilita la colonización de otros complejos bacterianos. El complejo verde incluye las especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens*, y *A. actinomycetemcomitans*. El agrupamiento naranja incluye especies de *Fusobacterium*, especies de *Prevotella*, *Micromonas (Peptostreptococcus) micros*, especies de *Campylobacter*, y especies de *Eubacterium*. Los miembros del complejo naranja reconocen y se unen a los colonizadores tempranos y estimulan la colonización de las especies del complejo rojo. Estas bacterias están asociadas con la formación de "puentes" y la liberación de nutrientes en la biopelícula para que otras bacterias se unan y colonicen. Por último, el complejo rojo consiste en tres especies, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, y *Treponema denticola*. Estas se encuentran en gran número en sitios con enfermedad grave, fosetas profundas y lesiones avanzadas (Rose *et al.*, 2004). Las tres especies se encuentran juntas en áreas de placas adyacentes al revestimiento epitelial del surco gingival.

Dos de los patógenos periodontales gram-negativos bien conocidos son *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. *P. gingivalis* está implicado en el avance de la periodontitis crónica. Se ha demostrado que posee componentes moleculares y una estructura que facilita su adherencia a los tejidos y las células del hospedante, tales como las células epiteliales gingivales. De forma importante, el microorganismo es un patógeno intracelular, puesto que puede invadir y multiplicarse dentro de células epiteliales (Holt y Ebersole, 2005). *P. gingivalis* presenta un nuevo mecanismo de colonización de los tejidos del hospedante y para eludir las respuestas inmunológicas del hospedante propagándose de una célula a otra sin pasar a través del espacio extracelular (Yilmaz *et al.*, 2006). *F. nucleatum* se considera una bacteria importante para el desarrollo de las biopelículas de la placa dental y tiene el potencial de ser patógena. Se cree que apoya el crecimiento de la placa dental actuando como puente entre la colonización temprana y tardía de las bacterias (Bolstad *et al.*, 1996). Es importante para la salud controlar la velocidad a la cual dichas especies bacterianas colonizan la cavidad oral.

La expresión dióxido de cloro se emplea mucho en la industria. Los expertos en la técnica conocerán sus diversas formas o variaciones que están disponibles para llevar a cabo ciertas funciones y objetivos previstos. Además, la patente de EEUU n.º 3.271.242 describe una forma de dióxido de cloro estabilizado y un procedimiento para fabricar el producto, que es particularmente útil para realizar la presente invención.

Las propiedades bactericidas del dióxido de cloro ya eran bien conocidas antes de su primer uso aplicable en los años cincuenta (Masschelein, 1979). El dióxido de cloro se emplea como tratamiento del agua potable obteniéndose a partir del clorito de sodio, para producir una disolución sin cloro. El dióxido de cloro estabilizado es una disolución acuosa que comprende clorito y estabilizantes. Cuando el pH del dióxido de cloro estabilizado disminuye desde un pH neutro se libera dióxido de cloro molecular de la disolución acuosa. Este mecanismo de acción del dióxido de cloro estabilizado tiene efectos bactericidas y bacteriostáticos sobre la ecología microbiana de bacterias patógenas aerobias, facultativas y anaerobias.

La presente invención se refiere al uso de una composición que contiene dióxido de cloro estabilizado que puede emplearse para el tratamiento de la boca en una disolución, por ejemplo, como colutorio o enjuague, en concentraciones por debajo de aproximadamente 0,8% (en p/v) para el control de bacterias que provocan enfermedades, la placa bacteriana y el mal olor oral. El enjuague también puede aromatizarse con la adición de extractos o aceites de menta. El aroma no debe interactuar con el dióxido de cloro estabilizado ni afectar a la estabilidad de la formulación.

Para líquidos, tales como colutorios, la unidad de medición convencional cuando se expresa la concentración es el porcentaje en peso-volumen. Es decir, un peso concreto de un componente, sólido, líquido o disuelto en un

disolvente, está presente en un volumen concreto de colutorio total.

Una "composición para el cuidado oral tópica" o "composición oral", tal como se emplea en la presente, significa un producto que no se traga deliberadamente con el objetivo de la administración sistémica de agentes terapéuticos, sino que se mantiene en la cavidad oral durante un tiempo suficiente para que se ponga en contacto con sustancialmente todas las superficies dentales y/o tejidos de la mucosa oral con el objetivo de una actividad oral.

Invencciones previas han contemplado el uso del dióxido de cloro estabilizado como bactericida para el tratamiento de la gingivitis, y también como agente desodorante para el tratamiento del mal olor oral (Ratcliff, documento US 4.689.215; Madray, documento US 6.231.830; Richter, documento US 5.738.840; Witt, documento US 6.350.438). Existe un gran número de pruebas que indican que el dióxido de cloro tiene propiedades bactericidas y que el dióxido de cloro sirve para atacar los compuestos de azufre volátiles del mal olor en la boca rompiendo los enlaces sulfuro (Lynch, 1997; Silwood, 2001).

Las composiciones de la técnica anterior que se han empleado y ensayado se han aceptado hasta un grado de eficacia para el tratamiento o la prevención de la periodontitis, la gingivitis, la acumulación de placa y el olor bucal. Patentes anteriores de Ratcliff han demostrado el efecto bactericida del dióxido de cloro estabilizado sobre *Streptococcus sanguinis* (patentes de EEUU n.ºs 4.851.213 y 4.889.714). En estas se divulga un procedimiento para reducir la placa dental alterando la ecología de las bacterias orales durante un periodo de diez segundos reduciendo la bacteria *S. sanguinis* en más del 90%. También divulgan la ruptura de dobles enlaces en las glucosiltransferasas presentes en la cavidad oral.

En la patente de EEUU 5.348.734 de Ratcliff se indica un intervalo de concentración del 0,005-0,5% (en p/v) de dióxido de cloro con fosfato aproximadamente al 0,02%-3,0%. Este es el intervalo más alto reivindicado en la técnica anterior. La presente invención prueba que unas concentraciones mayores del dióxido de cloro estabilizado son bactericidas para las bacterias orales a una velocidad más rápida y en entornos microbianos más complejos que la técnica anterior.

La presente invención se centra en las propiedades bacteriostáticas del dióxido de cloro estabilizado. Las pruebas de la presente demuestran que los efectos del dióxido de cloro estabilizado sobre las bacterias reducen significativamente la reproducción bacteriana. No existen indicaciones en la técnica anterior sobre un efecto inhibidor sobre patógenos periodontales, lo cual hace que la presente invención sea un agente eficaz para la prevención y el tratamiento de enfermedades orales y el desarrollo de la placa.

En la patente de EEUU de Doyle (n.º 6.846.478) se divulga que las composiciones orales con iones clorito en una mezcla son eficaces para controlar trastornos y enfermedades bacterianos en la cavidad oral y que inhiben la propagación de las bacterias hacia la corriente sanguínea. Además, la patente de EEUU n.º 7.087.228 (Goodman) divulga una composición para prevenir la caries dental y la endocarditis infecciosa mediante el tratamiento de la cavidad oral para bacterias, que incluyen *Streptococcus mutans*. Sin embargo, estas invenciones no son específicas con respecto al dióxido de cloro estabilizado como ingrediente activo para la prevención y el tratamiento de enfermedades orales debidas a trastornos bacterianos polimicrobianos en la cavidad oral.

La enfermedad periodontal surge de la respuesta de los tejidos a la ecología polimicrobiana de la placa subgingival. La ecología diversa y compleja de la cavidad oral conduce a una respuesta más resistente al sistema inmunológico y los fármacos antimicrobianos. Para investigar un entorno más natural de la cavidad oral con enfermedad periodontal, es importante desarrollar condiciones experimentales que imiten la diversidad y complejidad de la ecología bacteriana. Existe un número limitado de estudios que demuestran una cantidad considerable de muerte bacteriana e inhibición de la placa bacteriana sobre dichos entornos microbianos. La presente invención toma en consideración la diversa ecología natural e investiga las propiedades bactericidas y bacteriostáticas en suspensiones microbianas mixtas de muchas bacterias orales implicadas en enfermedades periodontales. Las invenciones previas y la investigación anterior han implicado la investigación de cultivos en suspensión bacterianos individuales, que no representan de forma precisa la ecología oral natural.

Se observan pruebas que apoyan las propiedades antimicrobianas de la presente invención en el estudio de Botha y Molobela sobre la inhibición de organismos orales individuales con un comprimido concentrado de dióxido de cloro (2006). El estudio concluyó que el dióxido de cloro es un agente antibacteriano eficaz cuando se ensaya contra los siguientes patógenos orales: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. (forsythensis) forsythia*, y *E. corrodens*. Las susceptibilidades fueron variadas según los diferentes organismos, pero desde luego se observó inhibición del crecimiento. Los resultados también sugieren que las susceptibilidades de las bacterias frente al dióxido de cloro no muestran un efecto antibacteriano lineal a concentraciones crecientes de dióxido de cloro. La presente invención apoya estos descubrimientos y es una extensión a una estrategia global para representar la ecología oral como un entorno diverso.

El documento EP 0 613 678 (de Micropure) divulga una composición basada en una disolución de dióxido de cloro estabilizado como colutorio o composición dentífrica.

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una disolución que contiene dióxido de cloro estabilizado, tal como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá con mayor especificidad y claridad haciendo referencia a los dibujos, en los que:

10 la figura 1 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,1% (en p/v) sin aromatizar a las 0 horas, 17 horas, y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta;

la figura 2 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a agua destilada (control) a las 0, 17 y 36 horas de incubación, que actúa como control negativo para la comparación con el enjuague oral con una concentración del 0,1% mostrado en la figura 1;

15 la figura 3 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,4% (en p/v) sin aromatizar a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta;

20 la figura 4 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,5% (en p/v) sin aromatizar a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta;

la figura 5 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a agua destilada (control) a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta, que actúa como comparación con el enjuague oral con una concentración del 0,5% (en p/v) sin aromatizar mostrado en la figura 4;

25 la figura 6 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,5% (en p/v) aromatizado a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta (nótese la recurrencia de un recuento de *F. nucleatum* en la exposición 3; esto puede ser debido a una resistencia bacteriana o a un error técnico);

30 la figura 7 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a agua destilada (control) a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta, que actúa como comparación con el enjuague oral con una concentración del 0,5% (en p/v) aromatizado mostrado en la figura 6;

la figura 8 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,6% (en p/v) aromatizado a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta;

35 la figura 9 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,6% (en p/v) sin aromatizar a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta; también se muestra una comparación entre el enjuague y los controles (dH₂O y ETSB-YE);

la figura 10 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,8% (en p/v) aromatizado a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta; también se muestra una comparación entre el enjuague y los controles (dH₂O y ETSB-YE);

40 la figura 11 muestra la viabilidad bacteriana después de exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral con una concentración del 0,8% (en p/v) sin aromatizar a las 0, 17 y 36 horas de incubación, contra una suspensión bacteriana mixta; también se muestra una comparación entre el enjuague y los controles (dH₂O y ETSB-YE); y

45 la figura 12 muestra la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) después de exposiciones de un (1) minuto al enjuague oral sin aromatizar (concentración de ensayo T₀ = 10⁸); los controles incluidos en este ensayo son clorhexidina, caldo de cultivo neutralizante, dH₂O, y caldo de cultivo Pg (*Porphyromonas gingivalis*).

Descripción de la realización preferida

La presente invención es como se indica en la reivindicaciones. Contempla el uso del dióxido de cloro estabilizado

como agente bactericida y bacteriostático contra los microorganismos implicados en la enfermedad oral, tales como, pero sin limitarse a *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus* y *A. viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros*, *Streptococcus sanguinis* y *S. oralis*, *Campylobacter reclus*, y *Enterococcus faecalis*. El mecanismo para dicha composición incluye la determinación de la actividad bactericida del dióxido de cloro estabilizado contra un espectro de bacterias orales, como bacterias individuales y como comunidades polimicrobianas, asociadas con las enfermedades periodontales y la salud.

El uso de la presente invención proporciona una composición de dióxido de cloro estabilizado que actúa como bactericida y bacteriostático sobre comunidades bacterianas orales a un intervalo de concentración de entre 0,6%-0,8% (en p/v). Tiene el efecto de matar y reducir el número de bacterias gram-negativas y gram-positivas a concentraciones mayores que las conocidas en la técnica anterior. Este efecto es imprevisto, puesto que se cree que mostraría una relación lineal en la cantidad de bacterias muertas. Sin embargo, se ha descubierto que se produce una velocidad exponencial de muerte bacteriana en los estudios *in vitro*. Se supone que, a una concentración del 0,2% (en p/v), la velocidad de muerte debería de ser el doble que a la concentración del 0,1% (en p/v), según se determina en una relación lineal. Esta correlación no se observa en los ensayos realizados como prueba de la presente invención. Parece haber un efecto exponencial sobre los microorganismos a medida que aumenta la concentración del dióxido de cloro estabilizado.

La presente invención establece la cinética bactericida de las características antimicrobianas del dióxido de cloro estabilizado contra comunidades bacterianas mixtas. La estrategia experimental de evaluar las bacterias como una comunidad y no como una entidad individual es importante, porque las bacterias orales no aparecen en la boca como una única especie, sino como una comunidad de especies bacterianas diversas y complejas. Los ensayos convencionales no ensayan la muerte bacteriana en entornos similares a la placa ni en suspensiones polimicrobianas, tal como se ha hecho en la experimentación de la invención. Este entorno reduce la susceptibilidad a antimicrobianos y hace que sea más difícil controlar y evitar el avance hacia condiciones de enfermedad.

La composición actúa como bactericida sobre las siguientes bacterias: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus* y *A. viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros*, *Streptococcus sanguinis* y *S. oralis*, *Campylobacter rectus*, y *Enterococcus faecalis*. Se cree que es eficaz sobre la mayoría de las bacterias orales implicadas en el avance de las enfermedades orales y la periodontitis. Cuando se suspende en un cultivo polimicrobiano de múltiples especies de bacterias orales, la presente invención mata y reduce el recrecimiento de las bacterias orales asociadas con enfermedades orales y bacterias oportunistas, más específicamente con bacterias orales gram-negativas anaerobias/aerobias/facultativas y gram-positivas anaerobias/aerobias/facultativas.

El enjuague oral de dióxido de cloro estabilizado se utiliza como tratamiento bacteriostático sobre bacterias orales en cultivos mixtos a lo largo de un periodo de 48 horas. Contempla la capacidad del dióxido de cloro estabilizado como agente bacteriostático contra las bacterias orales implicadas en las enfermedades periodontales. Por ejemplo, se ha demostrado en la presente invención que el recrecimiento de *P. gingivalis* se inhibe, lo cual demuestra un efecto bacteriostático sobre este patógeno periodontal gram-negativo específico. Existe poca o ninguna investigación o técnica que reivindique el crecimiento inhibido de bacterias orales, tales como *P. gingivalis*, después de la exposición a dióxido de cloro estabilizado. La investigación sugiere que el dióxido de cloro estabilizado provoca efectos bacteriostáticos sobre las células bacterianas que, en último término, conducen a la muerte celular. Esta inhibición del metabolismo celular y la función celular inhibe o controla, de forma eficaz, la formación de la placa bacteriana y los compuestos de azufre volátiles de mal olor, los principales contribuyentes a la enfermedad oral y la formación de la placa.

El mecanismo específico mediante el cual el dióxido de cloro inactiva a las bacterias se está postulando e investigando en la actualidad. Por tanto, se cree que las propiedades bacteriostáticas de la composición son debidas a la inhibición de la síntesis de proteínas y/o a la incapacidad de la célula para mantener la permeabilidad de la membrana y unos procesos metabólicos inhibidos. Debido a estos efectos sobre las bacterias, la producción de placa y el avance hacia las enfermedades orales pueden ser inhibidos mediante un enjuagado con una disolución del dióxido de cloro estabilizado en un intervalo de concentración del 0,6% al 0,8% (en p/v). La producción de compuestos orales de mal olor (VSC) también puede inhibirse. Los siguientes mecanismos de acción especifican las explicaciones para la muerte bacteriana por dióxido de cloro.

El mecanismo de acción específico del dióxido de cloro sobre las células se ha debatido durante una serie de años. Las investigaciones tempranas demostraron que el principal efecto del dióxido de cloro es la alteración de la síntesis de proteínas, lo cual conduce a la muerte celular (Bernarde *et al.*, 1967). Los resultados de los estudios de Bernarde demuestran claramente una inhibición abrupta de la síntesis de proteínas. Las explicaciones de este suceso en las células incluyen la posible inhibición de la activación de aminoácidos, la inactivación del ARN mensajero (que evita la traducción), y la destrucción de ribosomas por el dióxido de cloro (que provoca una pérdida

en los contenidos celulares por escape).

Sin embargo, un estudio posterior ha indicado que puede que este no sea el caso. Roller *et al.* estudiaron los efectos del dióxido de cloro sobre enzimas deshidrogenasas, la síntesis de proteínas y el ácido desoxirribonucleico de bacterias (Roller *et al.*, 1986). Los resultados demuestran que todas las enzimas deshidrogenasas fueron completamente inhibidas en los primeros 5 segundos de reacción por el dióxido de cloro, y que la síntesis de proteínas fue parcialmente inhibida. Se descubrió que la dosificación de dióxido de cloro utilizada era proporcional al grado de inhibición. Estos estudios concluyeron que el principal efecto del dióxido de cloro sobre las células estaba sucediendo en un área de la célula distinta de las enzimas deshidrogenasas, el complejo de síntesis de proteínas o el ADN. Se determinó que la inhibición de la síntesis de proteínas en la célula, en efecto, contribuye a la muerte celular. Sin embargo, Roller *et al.* concluyeron que se está produciendo una alteración de las funciones de la célula incluso antes de la síntesis de proteínas. Se demostró que el dióxido de cloro no provoca la inactivación de la célula por la alteración o el deterioro del ADN de la célula. Una explicación o teoría de las muertes celulares por dióxido de cloro en este estudio es por una reacción con componentes, o la oxidación de estos componentes, relacionados con la actividad enzimática de la célula (Roller *et al.*, 1986).

Un estudio más reciente sobre el mecanismo de acción del dióxido de cloro fue llevado a cabo por Berg *et al.* (1986). Berg *et al.* estudiaron el efecto del dióxido de cloro sobre las funciones de membrana de *Escherichia coli* y descubrieron que el control de la permeabilidad estaba alterado, conduciendo a la muerte celular. También se demostró que la inactivación por dióxido de cloro no provoca una pérdida significativa de las macromoléculas intracelulares que existen dentro de la célula hacia el entorno circundante. Sin embargo, los daños en la membrana conducen a la pérdida de potasio intracelular, destruyendo el gradiente iónico transmembrana, que se cree que resulta en la inhibición letal de los procesos metabólicos y a la muerte celular. Así, se determinó que la barrera de permeabilidad de la célula es importante para la sensibilidad al dióxido de cloro y las características de crecimiento de la célula.

Las pruebas de la presente investigación sugieron que el dióxido de cloro estabilizado provoca efectos bactericidas y bacteriostáticos en las células bacterianas que conducen en último término a la muerte celular. Estos efectos pueden conducir a un control sobre la formación de la placa bacteriana y los compuestos de azufre volátiles de mal olor, los principales contribuyentes a las enfermedades orales.

Para ensayar las propiedades bactericidas del dióxido de cloro estabilizado sobre una única especie de bacteria oral y sobre suspensiones bacterianas mixtas, se ensayaron disoluciones con las concentraciones especificadas (intervalo de concentración entre 0,1%-0,8% (en p/v)) en ensayos *in vitro* que contienen la bacteria. Las experimentaciones incluyeron ensayar disoluciones de enjuague oral aromatizadas y no aromatizadas.

Para ensayar las propiedades bacteriostáticas del dióxido de cloro estabilizado, se ensayó una disolución que consistía en dióxido de cloro estabilizado a una concentración del 0,1% (en p/v) *in vitro* con bacterias orales.

Materiales:

Actinomyces viscosus ATCC 43146

Actinomyces odontolyticus ATCC 17929

Campylobacter rectus ATCC 33238

Enterococcus faecalis ATCC 10741

Fusobacterium nucleatum ATCC 49256

Micromonas (Peptostreptococcus) micros ATCC 33270

Porphyromonas gingivalis ATCC 49417

Prevotella intermedia ATCC 25611

Streptococcus sanguinis ATCC 10556

Streptococcus oralis ATCC 35037

Enjuague oral con agente aromatizante

Enjuague oral sin agente aromatizante

ES 2 543 132 T3

Caldo de cultivo neutralizante Difco™ (aproximadamente 800 ml)

TSBYE enriquecido (aproximadamente 400 ml)

Salvia artificial + triptona al 5% + extracto de levadura al 5% (aproximadamente 2.500 ml) (AS+T+Y)

5

Cloruro de calcio 0,147 g/l (CaCl_2)

Fosfato de sodio 0,426 g/l (Na_2HPO_4)

Bicarbonato de sodio 1,68 g/l (NaHCO_3)

Tubos de centrifuga de 90-50 ml

Pipetas de 25 ml, 10 ml, 5 ml, y 0,1 ml

10

Pipeteador

9 matraces Erlenmeyer estériles

Tubos de ensayo estériles

39 de cada agar selectivo para un total de 312 placas (prerreducido durante 48 hrs)

Medio de crecimiento óptimo y agares selectivos (el medio se prerredujo durante 24 hrs):

15

Caldo de cultivo CR y agar CR-*C. rectus*

Caldo de cultivo BHIB y agar BHIB pH = 9,6-*E. faecalis*

Caldo de cultivo tratado con TSBYE invertasa y agar MSss/MSN-*S. sanguinis* y *S. oralis*

Caldo de cultivo Schaedler y agar CVE-*F. nucleatum*

20

Caldo de cultivo Pm y agar MSCN-*M. micros*

Caldo de cultivo Pg y agar BPB+MUP-*P. gingivalis*

Caldo de cultivo BHIB y agar CFAT+MUP-*A. viscosus*

ETSBYE-para todas las bacterias

25

Agar sangre

30

La determinación de la actividad bactericida del enjuague de dióxido de cloro estabilizado se realizó con suspensiones bacterianas orales individuales que están asociadas con la gingivitis, las enfermedades periodontales y la salud. Se ensayaron las siguientes bacterias de forma individual en un sistema de ensayo de placas de microtitulación: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Campylobacter rectus* y *Enterococcus faecalis*.

Los organismos empleados en los experimentos son aislados de the American Type Culture Collection (ATCC) y se obtuvieron originariamente de infecciones orales. Todas las bacterias están permanentemente almacenadas como un criobanco a -90 °C.

35

Los cultivos primarios se cultivaron en medio convencional enriquecido apropiado para la especie en una cámara anaerobia (Coy) a 37 °C durante 48 horas. Las células se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron 2x en medio estéril prerreducido. Las células se suspendieron en medio estéril prerreducido y se ajustaron a concentraciones estandarizadas basándose en curvas patrón de concentración celular y absorbancia mediante espectroscopía.

40

Los ensayos bactericidas se realizaron en un montaje de placa de microtitulación. Los componentes del ensayo

consistían en suspensiones bacterianas estandarizadas, con unas concentraciones de células de partida de 10^6 - 10^7 CFU/ml, diluciones antimicrobianas, y medio estéril. Se empleó un intervalo de concentraciones de enjuague, diluido en agua destilada estéril. Los controles positivos consistieron en clorhexidina al 0,12%, y los controles negativos fueron agua destilada estéril (dH₂O). En una serie de ensayos, también se incluyó el agente aromatizante.

Las placas de microtitulación se incubaron en una cámara anaerobia entre los momentos de tiempo del ensayo. Las muestras se retiraron en diferentes momentos del tiempo y se procesaron para determinar el número de células viables mediante una metodología de placa en espiral empleando un sistema Spiral Plate 4000. El sistema de placa en espiral se empleó para determinar los recuentos de células bacterianas y el grado de susceptibilidades antimicrobianas. Se observaron unos tiempos de exposición de 1, 5 y 10 minutos.

Los recuentos microbianos brutos inicialmente se transformaron en valores de log₁₀ para normalizar los datos antes de realizar el análisis estadístico. Esta es una práctica convencional y se emplea mucho para evaluar el número de bacterias en ensayos antimicrobianos. Los datos se analizaron principalmente mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). En algunos casos, si se obtienen varianzas desiguales, los datos también se analizaron mediante un ANOVA de Kruskal-Wallis no paramétrico. En el primer caso, si se observa una significancia estadística, se realizaron postensayos de Tukey-Kramer para determinar las diferencias entre los grupos. En el segundo caso, se realizaron ensayos de comparación múltiple de Dunn. La significancia estadística se ajustó a $\alpha = 0,05$. Los datos se analizaron mediante un ensayo de la t de Student.

Se observó una tendencia general entre los anaerobios gram-negativos: estas bacterias son más susceptibles al enjuague de dióxido de cloro estabilizado a la concentración del 0,1% (en p/v) (los datos no se muestran). Se observó una reducción en el número de células viables después de una exposición de un minuto para *Fusobacterium nucleatum*, aunque los datos no fueron estadísticamente significativos. De modo similar, se observó una reducción de las células viables con *Porphyromonas gingivalis*. Sin embargo, se observó la muerte total del inóculo en los experimentos con una exposición de 10 minutos.

Se observó un perfil de susceptibilidad ligeramente diferente con *Prevotella intermedia*, una bacteria gram-negativa anaerobia. Se observaron disminuciones estadísticamente significativas en el número de células viables con una exposición de 1 y 5 minutos, sobreviniendo la muerte total a los 5 minutos.

Los resultados de los experimentos con *Campylobacter rectus* indican que una exposición de 1 minuto a concentraciones de enjuague oral produce reducciones estadísticamente significativas en el número de células viables en el ensayo. El enjuague oral produce una muerte >95% con un minuto de exposición a *Campylobacter rectus* (anaerobio gram-negativo).

En conclusión, el enjuague oral ha mostrado unos fuertes efectos de viabilidad bacteriana contra bacterias orales anaerobias gram-negativas. Además, estas bacterias se ensayaron en mezclas polimicrobianas, que están asociadas con el desarrollo y el avance de enfermedades periodontales e infecciones.

La composición de las mezclas polimicrobianas se diseñó para incluir organismos asociados con la salud y la enfermedad (que consisten en las mismas bacterias empleadas en los ensayos de suspensión de bacterias orales individuales anteriores).

El objetivo de este experimento es determinar si existe un efecto bactericida sobre una suspensión bacteriana mixta cuando la suspensión se expone al enjuague oral en múltiples momentos (0, 17 y 36 horas) con una duración de un minuto a unas concentraciones que varía del 0,1% al 0,8% (en p/v). Se detallan los siguientes procedimientos para una concentración de enjuague oral del 0,4% (en p/v), que se modificaron en consecuencia para otras concentraciones ensayadas, que incluyen concentraciones de 0,1%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, y 0,8% (en p/v).

El ensayo realizado fue similar al llevado a cabo para las bacterias individuales, excepto que el enjuague oral se evaluó contra suspensiones bacterianas mixtas. Cada uno de los organismos bacterianos (0,1 ml para aerobios y 0,5 ml para anaerobios) fue inoculado en 50 ml de medio de crecimiento óptimo y se incubó durante 24 horas (aerobios) y 48 horas (anaerobios). Tras haber completado el periodo de incubación, 25 ml de las disoluciones madre bacterianas se centrifugaron a 7500 veces la gravedad (7500xg) durante 10 minutos y se resuspendieron en 25 ml de ETSBYE. Se realizaron dos diluciones 10^{-2} a partir de estas resuspensiones en ETSBYE (0,1 ml de resuspensión en 10 ml de ETSBYE). La segunda de las diluciones se cultivó en placa sobre agar sangre para obtener un recuento de CFU/ml de los cultivos originariamente cultivados. Para verificar la concentración inicial de *F. nucleatum* para la suspensión mixta, se añadieron 3,5 ml del cultivo inicial a 6,5 ml de caldo de cultivo Schaedler. Este después se diluyó 10^{-2} y 10^{-4} y se cultivó en placa en espiral sobre agar sangre y agar CVE.

La siguiente tabla muestra el volumen de cada bacteria añadida para crear 35 ml de una suspensión de cultivo

mixto a $1,2 \times 10^8$ CFU/ml. Tras crear la suspensión mixta, la suspensión se diluyó 10^{-2} y 10^{-3} y se cultivó en placa en espiral sobre agares selectivos y agar sangre, respectivamente. A660 es la absorbancia a 660 nm, que determina el número de células en suspensión.

Suspensiones de cultivo mixto		
Bacterias	Volumen añadido para lograr una suspensión de cultivo mixto (aprox. 1×10^6)	A660
<i>E. faecalis</i>	2,00	1,160
<i>S. oralis</i>	0,38	1,386
<i>S. sanguinis</i>	2,15	1,043
<i>A. viscosus</i>	8,70	0238*
<i>C. rectus</i>	1,98	0,502
<i>F. nucleatum</i>	12,00	1,030, 1,005
<i>M. micros</i>	3,50	0,258**
<i>P. gingivalis</i>	2,80	1,544
ETSBYE	1,49	
*- la A660 es tan baja porque las bacterias se habían adherido al fondo del matraz. El fondo del matraz se raspó con un asa estéril para permitir que entraran en suspensión, y se obtuvieron los recuentos de CFU/ml para el ensayo esperados. ** - la concentración parecer ser el doble mediante A660 aunque, según la curva patrón, había una minúscula diferencia y, por tanto, el experimento se realizó como se había calculado previamente.		

- 5 Los tubos de enjuague oral aromatizado y no aromatizado se ensayaron por triplicado juntos, y los tubos con dH₂O y ETSBYE (controles) se ensayaron por triplicado juntos. Cada tubo se preparó como sigue: se añadió la suspensión bacteriana, y el tubo de centrifuga se agitó en vórtice durante un minuto. Inmediatamente después de la exposición de un minuto se retiraron 22 ml y se añadieron a un tubo de centrifuga que contenía 22 ml de caldo de cultivo neutralizante. Este tubo de centrifuga después se agitó en vórtice durante 30 segundos. Los tubos se redujeron y después se centrifugaron a 8.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se añadieron 44 ml de AS-T-Y prerreducido. Los tubos después se centrifugaron a 8.000 x g durante 10 minutos más. De nuevo se retiró el sobrenadante y se añadieron 3 ml de AS+T+Y. Se realizaron diluciones de 10^{-2} y se cultivaron en espiral sobre los agares selectivos. Los tubos después se incubaron de modo anaerobio en un incubador a 37 °C durante 17 horas y se repitió el proceso. Este proceso se realizó a las 0 horas, 17 horas y 36 horas.
- 10
- 15 Al igual que en los ensayos realizados anteriormente, las placas de microtitulación se incubaron en una cámara anaerobia entre los momentos de tiempo del ensayo. Se recogieron muestras en diferentes momentos del tiempo y se procesaron para determinar el número de células viables mediante la metodología de cultivo en espiral empleando un sistema Spiral Plate 4000.
- 20 Los análisis estadísticos se realizaron de la misma manera que para los estudios de suspensión bacteriana individual, descritos anteriormente.
- 25 Los resultados para el efecto del enjuague oral a una concentración del 0,1% (en p/v) contra las suspensiones polimicrobianas se muestran en la figura 1. La muerte total de *C. rectus*, un patógeno periodontal anaerobio gram-negativo, se produjo después de la segunda exposición (17 horas) al enjuague oral a la concentración del 0,1% (en p/v). También se observaron reducciones significativas en el número de células viables de las otras bacterias ensayadas, que incluyen *F. nucleatum* y *P. gingivalis*. La figura 2 muestra el control de las exposiciones a agua destilada, que indica el efecto significativo del enjuague oral sobre la muerte de bacterias polimicrobianas cuando se compara con la figura 1. Los ensayos realizados que incluían un agente aromatizante en la disolución de enjuague oral muestran la muerte total de *C. rectus* y *P. gingivalis* después de la segunda exposición (los datos no se muestran).

A una concentración del 0,1% (en p/v) del enjuague oral, las bacterias gram-positivas normalmente asociadas con la salud oral mostraron pocos cambios después de múltiples regímenes de exposición. Pero los enjuagues más concentrados muestran un nivel mucho mayor de actividad bactericida (0,4, 0,5, 0,6 y 0,8%). Las exposiciones de suspensiones polimicrobianas a los enjuagues concentrados produjeron la muerte total de todos los organismos gram-negativos y gram-positivos en un momento tan temprano como después de la segunda exposición.

Los resultados indican que los patógenos periodontales gram-negativos anaerobios en suspensiones polimicrobianas son muy susceptibles a múltiples exposiciones breves al enjuague oral de dióxido de cloro estabilizado. El enjuague oral al 0,4% (en p/v) muestra una actividad bactericida muy fuerte, que produce unas reducciones significativas en los niveles de todas las bacterias dentro de la suspensiones polimicrobianas, tal como se muestra en la figura 3. De modo más específico, solo cuatro bacterias gram-positivas sobrevivieron a la primera exposición al enjuague oral (*S. sanguinis*, *E. faecalis*, *S. oralis*, y *A. viscosus*). De forma importante, los anaerobios gram-negativos, tales como *Porphyromonas gingivalis*, *F. nucleatum*, y *C. rectus*, fueron completamente eliminados después de la primera exposición al enjuague oral.

El nivel de actividad bactericida con el enjuague al 0,3% (en p/v) fue muy similar al enjuague a la concentración del 0,1% (en p/v) (los datos no se muestran). Se cree que este hecho es un efecto exponencial de la muerte sobre las bacterias del enjuague oral, porque se produjo un aumento brusco en la viabilidad bacteriana en respuesta al enjuague oral a las concentraciones del 0,4% (en p/v) y mayores. Este resultado se representa en las figuras que muestran los resultados de los ensayos con el enjuague oral al 0,4, 0,5, 0,6 y 0,8%. A la concentración del 0,5% de dióxido de cloro estabilizado, con y sin el agente aromatizante, los resultados en la muerte total de todas las bacterias en la suspensión polimicrobiana después de múltiples exposiciones a lo largo de 36 horas se muestran en las figuras 4 y 6. Tal como se ilustra en la figura 4, solo dos tipos de bacterias orales sobrevivieron después de la primera exposición y fueron totalmente destruidas en la segunda exposición después de 17 horas; estas dos bacterias fueron *E. faecalis* (bacteria anaerobia gram-positiva) y *A. viscosus* (bacteria aerobia gram-positiva). Los resultados obtenidos de las exposiciones al dióxido de cloro estabilizado pueden compararse con los controles de exposición al agua destilada mostrados en las figura 5 y 7 para comparar y observar claramente las diferencias significativas.

Las figuras 8 a 11 muestran la actividad bactericida del enjuague oral a las concentraciones del 0,6% y 0,8% (en p/v) con y sin el agente aromatizante (aromatizado y no aromatizado). El enjuague oral concentrado al 0,6% mata totalmente a todas las bacterias en la suspensión bacteriana mixta después de una primera exposición en el enjuague oral no aromatizado. La única bacteria que sobrevivió a la primera exposición en el enjuague oral aromatizado fue *A. viscosus*, una bacteria gram-positiva. Sin embargo, esta bacteria murió después de la segunda exposición 17 horas después. Los controles de dH₂O y ETSB-YE también se muestran en parte con el enjuague oral al 0,6%, tal como se ilustra en la figura 9. Puede observarse que había células vivas en los controles.

A la máxima concentración ensayada, al 0,8% (en p/v), no se aprecian señales de bacterias vivas después de la primera exposición en los enjuagues orales aromatizados y no aromatizados, tal como se muestra en las figuras 10 y 11, respectivamente. De nuevo, los controles en ambas figuras pueden compararse con el enjuague oral.

En conclusión, los enjuagues orales de dióxido de cloro estabilizado, con una concentración tan alta como 0,8% (en p/v), poseen un alto nivel de actividad bactericida que se dirige a anaerobios gram-negativos y aerobios/anaerobios gram-positivos. Los resultados demuestran una relación en función de etapa ascendente entre el efecto bactericida y la concentración del enjuague oral. Existe un aumento significativo en la muerte bacteriana en una suspensión polimicrobiana a la concentración del 0,4% y mayor. Un aumento lineal no parece ser la causa, debido al cambio en el efecto desde la concentración del 0,1% y 0,3% hasta la concentración del 0,4% del enjuague oral sobre la muerte de las bacterias orales.

Se realizaron experimentos de recrecimiento de la placa para demostrar el efecto bacteriostático del enjuague de dióxido de cloro estabilizado sobre bacterias orales, tales como *Porphyromonas gingivalis*. Suspensiones de *Porphyromonas gingivalis*, ajustadas hasta una concentración de ensayo de 10^6 - 10^8 CFU/ml, fueron expuestas a la concentración del 0,1% (en p/v) de enjuague oral durante un minuto. Las suspensiones fueron inmediatamente diluidas en medio fresco y después se incubaron a 37 °C en una cámara anaerobia.

Las pruebas sugieren que el enjuague oral de dióxido de cloro estabilizado es un agente bacteriostático eficaz, que inhibe la regeneración de las bacterias orales a lo largo de un periodo de 48 horas. Las propiedades bacteriostáticas del dióxido de cloro supondrían que es una disolución eficaz para prevenir la degradación de sustratos proteicos exógenos y endógenos, epitelio oral, restos de comida y saliva. De forma más importante, esto limitaría la producción de la placa dental y los compuestos de azufre volátiles.

Las células expuestas a agua destilada o medio fresco muestran una cinética de crecimiento normal, alcanzando una alta absorbancia a las 36 horas de incubación. Sin embargo, las células expuestas al enjuague oral,

aromatizado o no aromatizado, no fueron capaces de crecer a lo largo de un periodo de 48 horas. Este efecto se observó con *P. gingivalis* a 10^6 - 10^7 CFU/ml. La inhibición del crecimiento de *P. gingivalis* se muestra en la figura 12 como el resultado del enjuague oral sin aromatizar a una concentración del 0,1% (en p/v). Basándose en los datos obtenidos, se observa que una breve exposición al enjuague oral tiene un significativo efecto bacteriostático sobre el patógeno periodonal gram-negativo *Porphyromonas gingivalis*. Se cree que también tiene un efecto sobre las otras bacterias orales.

5

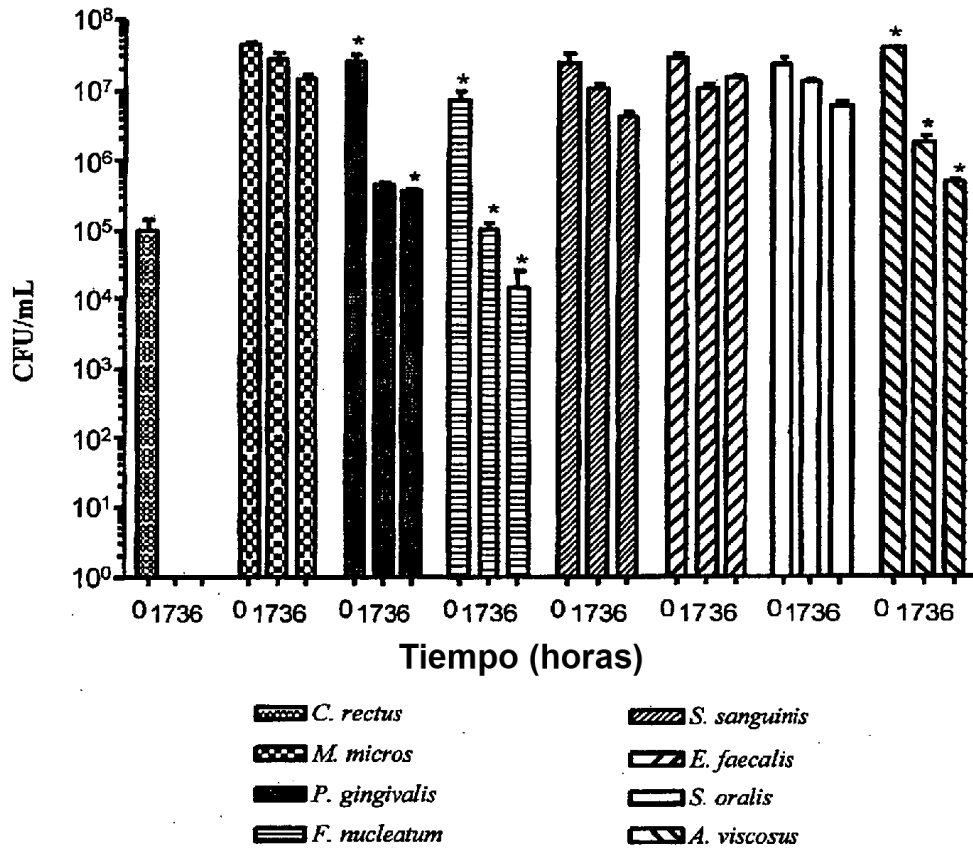
La adición del agente aromatizante al enjuague oral también tiene el mismo efecto sobre la inhibición del crecimiento de *P. gingivalis* (los datos no se muestran). Se sabe que los agentes aromatizantes normalmente tienen propiedades bactericidas, y el efecto se anticipa en estos ensayos. Además, puede determinarse si el agente aromatizante tiene un efecto beneficioso cuando se usa con el enjuague oral de dióxido de cloro estabilizado.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1.- El uso de una disolución de dióxido de cloro estabilizado que tiene una concentración en el intervalo del 0,6% al 0,8% (en p/v) para la fabricación de una composición para reducir y matar bacterias en un entorno microbiano dentro de la cavidad oral poblada por bacterias periodontales gram-negativas y gram-positivas, o para la interferencia bacteriostática con el crecimiento de patógenos periodontales gram-negativos y gram-positivos presentes en la cavidad oral, en el que dicha cavidad oral se enjuaga con la composición.
- 2.- El uso según la reivindicación 1, en el que la disolución es para crear una interferencia bacteriostática con el crecimiento de bacterias anaerobias y aerobias asociadas con enfermedades periodontales.
- 10 3.- El uso según la reivindicación 1, en el que la disolución es para interferir con la producción de proteínas para afectar negativamente al crecimiento de patógenos periodontales gram-negativos y gram-positivos.
- 4.- El uso según la reivindicación 1, en el que la disolución es para interferir con la producción de al menos uno de ADN y ARN para afectar negativamente al crecimiento de patógenos periodontales gram-negativos y gram-positivos.
- 15 5.- El uso según la reivindicación 1, en el que la disolución es para afectar a la capacidad de la célula bacteriana para mantener el control de la permeabilidad de la membrana.
- 6.- El uso según la reivindicación 1, en el que la disolución es para al menos reducir la presencia de patógenos periodontales gram-negativos, que incluyen cualquiera de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Campylobacter rectus*, en la cavidad oral.
- 20 7.- El uso según la reivindicación 1, en el que la disolución es para al menos reducir la presencia de patógenos periodontales gram-positivos, que incluyen cualquiera de *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Micromonas (Peptostreptococcus) micros*, y *Enterococcus faecalis*.
- 25 8.- El uso según la reivindicación 1, en el que las bacterias gram-negativas y gram-positivas incluyen *Campylobacter rectus*, *Micromonas (Peptostreptococcus) micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* y *Actinomyces viscosus*, y dicha composición es para matar a *Campylobacter rectus*, *Micromonas (Peptostreptococcus) micros*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* dentro de la primera hora, y es para reducir la presencia de *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* y *Actinomyces viscosus* dentro de la primera hora, y es para matar a *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* y *Actinomyces viscosus* dentro de las siguientes 17 horas.
- 30 9.- El uso según la reivindicación 6, en el que la disolución de dióxido de cloro estabilizado tiene una concentración en el intervalo de -0,6% al 0,8% (en p/v) y es para matar a *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Micromonas (Peptostreptococcus) micros*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis* dentro de la primera hora; al menos reducir la presencia de *Actinomyces viscosus* dentro de la primera hora; y matar a *Actinomyces viscosus* dentro de las siguientes 17 horas.
- 35 10.- El uso según la reivindicación 6, en el que la disolución de dióxido de cloro estabilizado tiene una concentración de al menos aproximadamente 0,8% (en p/v) y es para matar a *C. rectus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *M. micros*, *E. faecalis*, *A. viscosus*, *S. oralis* y *S. sanguinis* dentro de un minuto.
- 40 11.- El uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que incluye la etapa de añadir un aromatizante a la disolución de dióxido de cloro estabilizado.

Figura 1



significativamente diferente, $p < 0,05$

Figura 2

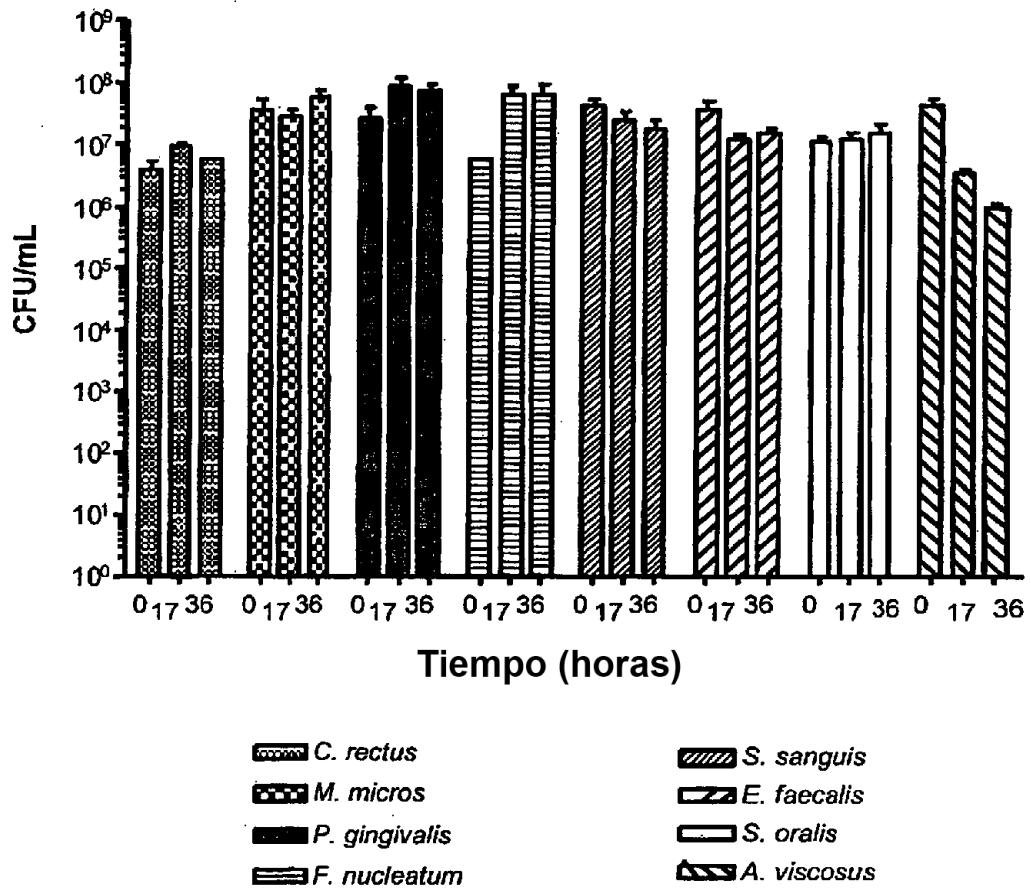


Figura 3

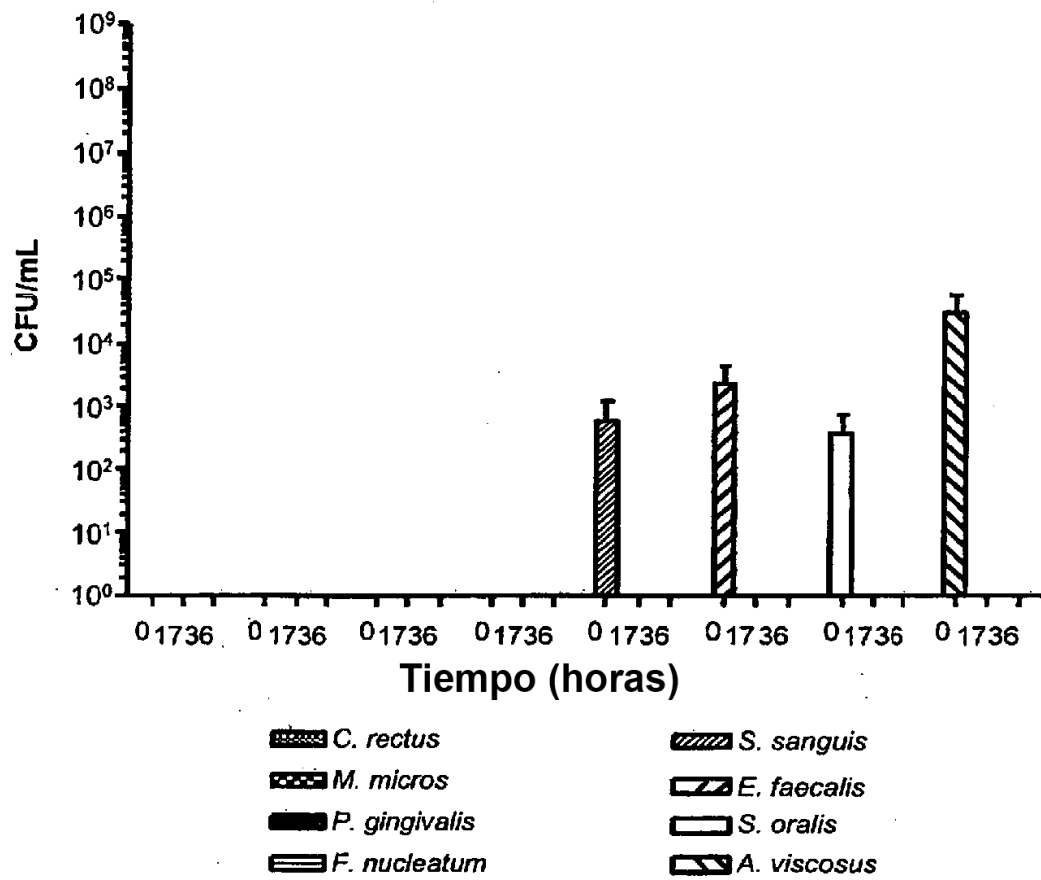
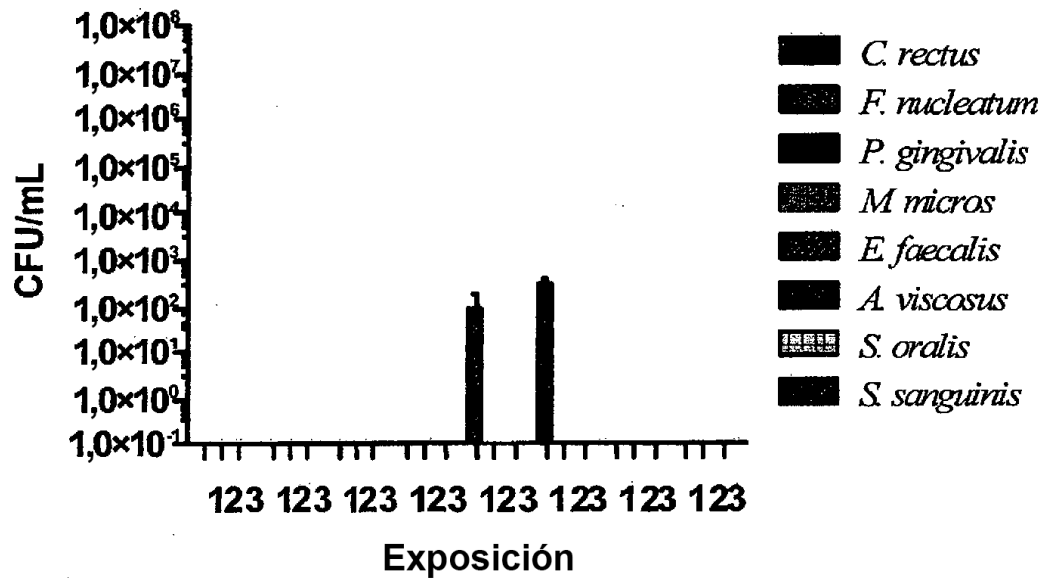
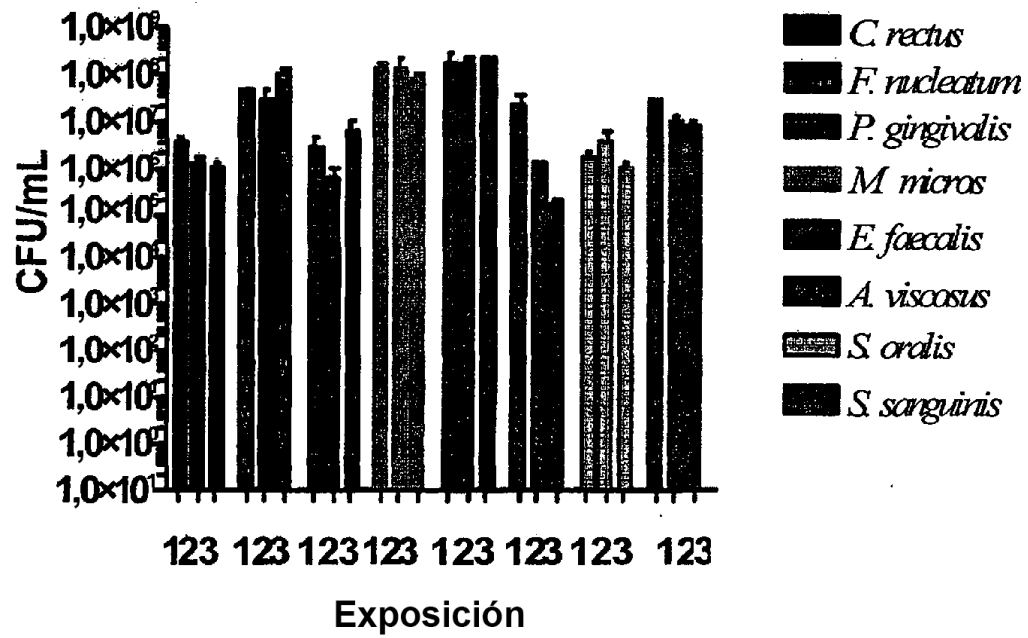


Figura 4



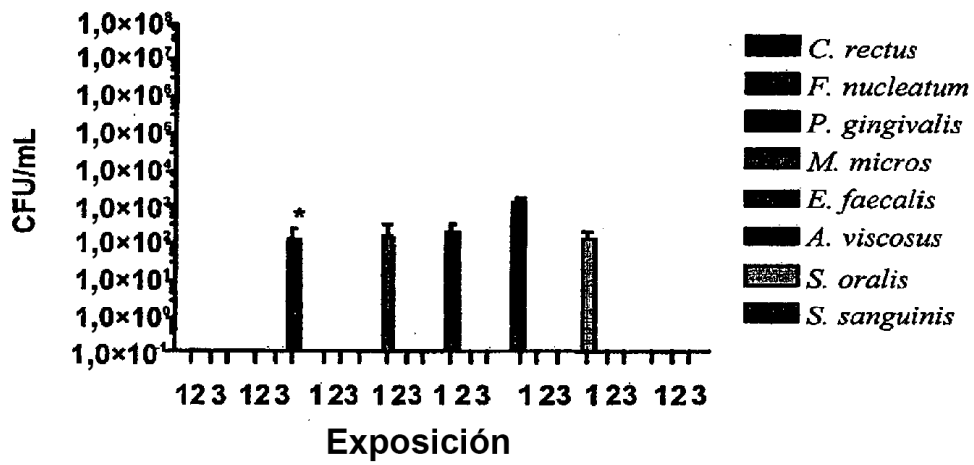
Exposición 1 = Tiempo 0
Exposición 2 = 17 horas
Exposición 3 = 36 horas

Figura 5



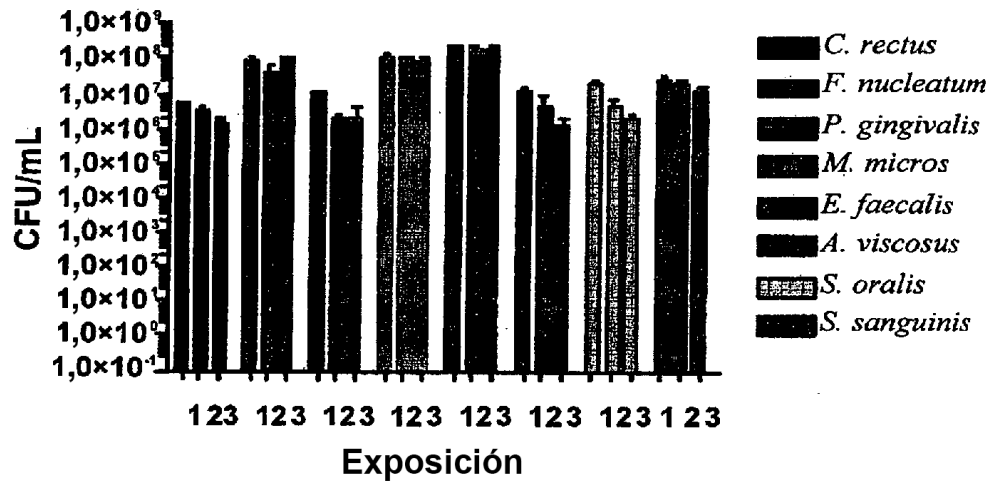
Exposición 1 = Tiempo 0
 Exposición 2 = 17 horas
 Exposición 3 = 36 horas

Figura 6



*La reaparición de recuentos bacterianos en este momento puede ser debida al desarrollo de resistencia bacteriana o al resultado de un error técnico.

Figura 7



Exposición 1 = Tiempo 0
Exposición 2 = 17 horas
Exposición 3 = 36 horas

Figura 8

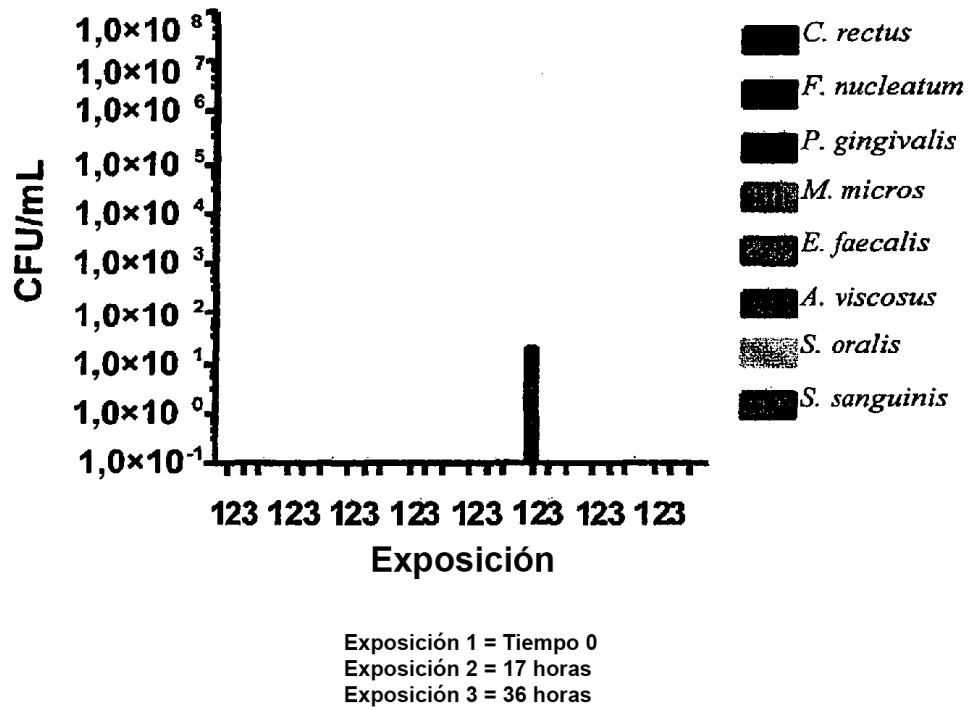


Figura 9

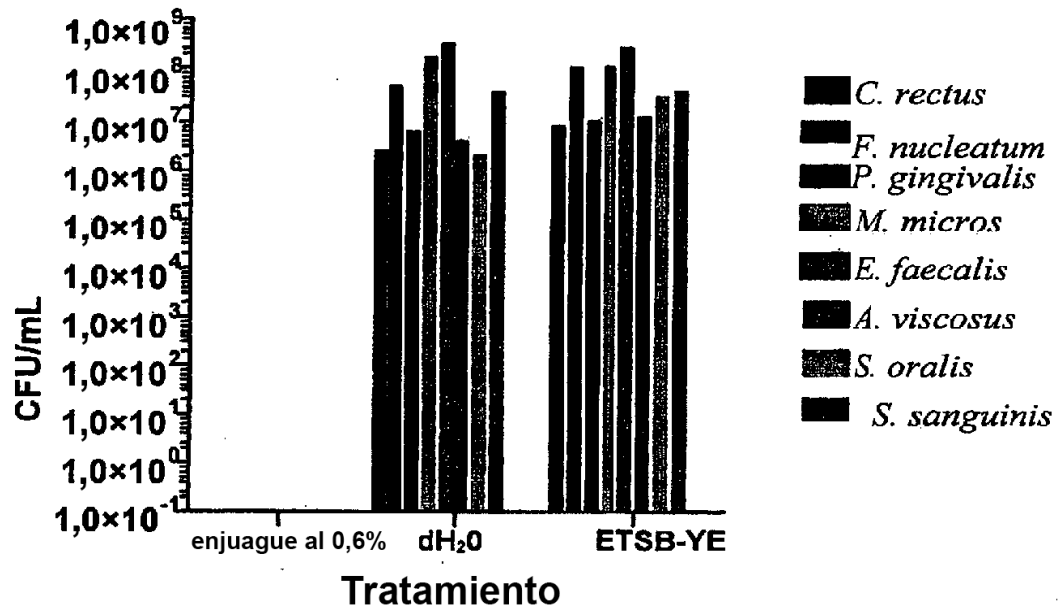


Figura 10

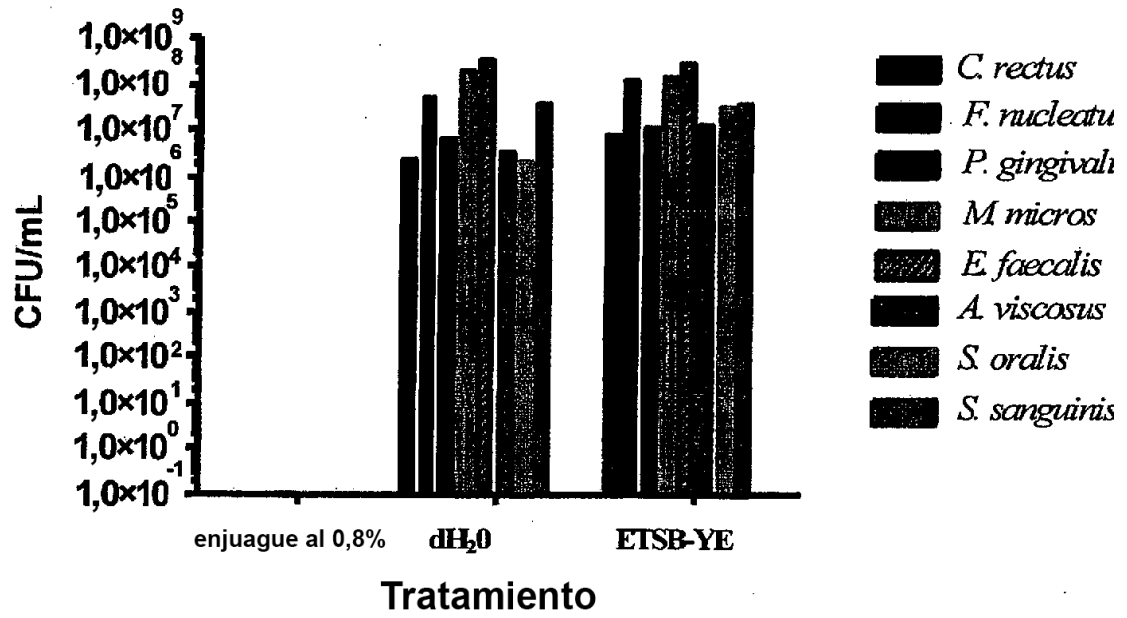


Figura 11

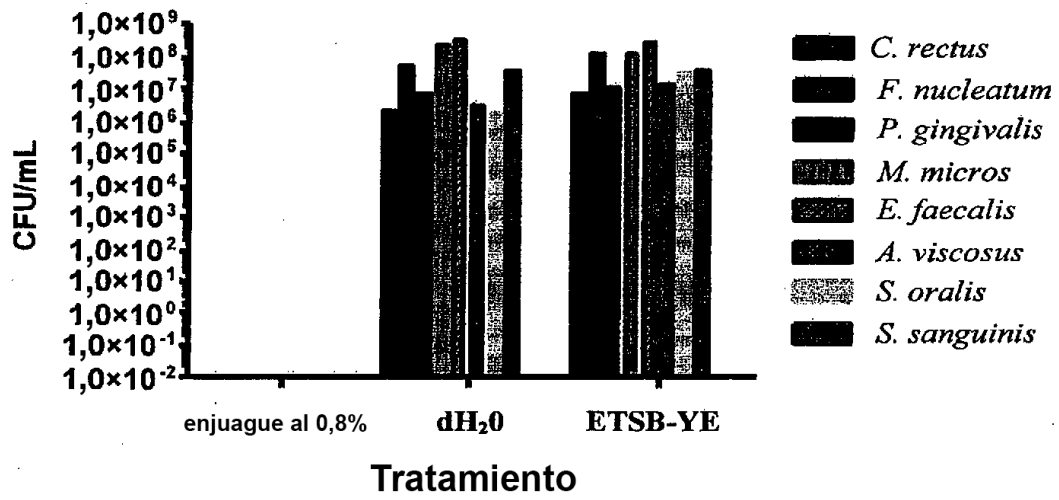


Figura 12

