

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 457**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/40** (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 14193943 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2921174**

54 Título: **Composición y procedimiento para la 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:

**20.09.2018**

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;  
RENKEN, ELIZABETH A. y  
YOUNG, ELENA J.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 682 457 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 para la prevención de una enfermedad oral

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

5 La presente invención se refiere a una solución para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades orales y la reducción de olores bucales mediante el uso de dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) estabilizado y estableciendo las propiedades bactericidas y bacteriostáticas a un intervalo de concentraciones del 0,1-0,8 % (p/v) para reducir significativamente la reproducción bacteriana y para actuar como agente antibacteriano sobre bacterias orales gramnegativas anaerobias/aerobias/facultativas y bacterias orales grampositivas anaerobias/aerobias/facultativas.

**10 2. Descripción de la técnica relacionada**

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, embebida en una matriz extracelular de polímeros del huésped y de origen microbiano” (Marsh, 2004). Las biopelículas de 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 recubren el revestimiento epitelial del surco gingival, conducen al desarrollo de infecciones periodontales (es decir, gingivitis y periodontitis) (Rose y col., 2004).

La placa dental supragingival se forma sobre los dientes en unas horas después de la limpieza de los mismos. Las proteínas salivares, tales como mucinas, proteínas ricas en prolina, estaterinas, histatinas y cistatínas, tienen una fuerte afinidad por el mineral hidroxiapatita (HAP) de los dientes. Estas proteínas se unen con rapidez a la HAP del diente para formar un revestimiento grueso, denominado la película adquirida. Determinadas bacterias en la cavidad oral se adhieren selectivamente a la película, comienzan a dividirse y forman colonias. En un primer momento, aproximadamente un 80 % de las bacterias que colonizan las superficies del diente revestidas con la película son cocos facultativos grampositivos no móviles, tales como *Streptococcus (sanguis) sanguinis* (patente US 4 889 714). El otro 20 % incluye una diversidad de bacterias gramnegativas, 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 otras bacterias a la masa de la biopelícula (placa). Un importante cambio ambiental en la biopelícula de placa es la disminución del potencial de oxidación-reducción local, creando así un entorno con un bajo contenido en oxígeno que promueve la colonización y el crecimiento de bacterias anaerobias. Los microorganismos en la biopelícula sintetizan una matriz limosa o glicocálix 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 embebida en la matriz, en la que la expresión génica está muy alterada (Marsh, 2005).

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

Debido a la asociación entre las biopelículas de la placa y las enfermedades orales, existe la gran necesidad de una formulación que inhiba la formación de la placa bacteriana frenando la velocidad de recrecimiento de las bacterias de la placa (patógenos gramnegativos y grampositivos) y reduciendo la presencia de organismos en cultivos mixtos o en un caldo de cultivo tales como, si bien no se limitan a los mismos: *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*.

La gingivitis es la inflamación de los tejidos conectivos gingivales alrededor de los dientes causada por la placa dental (Rose y col., 2004). Desde el punto de vista clínico se caracteriza por las señales clásicas de la inflamación, tales como enrojecimiento (rubor), hinchamiento (tumor), y temperatura elevada del tejido (calor). Además, el tejido afectado sangra cuando se toca suavemente. La gingivitis se puede prevenir mediante el cuidado oral habitual, pero si no se trata puede llevar a una enfermedad grave de las encías denominada periodontitis. La periodontitis también está causada 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 del periodonto inducida por la placa que lleva 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 en la degradación de sustancias orgánicas en la cavidad oral. Las bacterias en la

5 saliva, la placa y los revestimientos de la lengua producen los compuestos de azufre volátiles (VSC) que incluyen:  
 sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), metilmercaptano (CH<sub>3</sub>SH), y dimetilmercaptano, que son los principales contribuyentes  
 del mal olor oral (Loesche y Kazor, 2002). Las bacterias orales, que incluyen los anaerobios gramnegativos que se  
 encuentran en la placa subgingival, producen diversos compuestos malolientes, que incluyen VSC y ácidos  
 orgánicos tales como el ácido butírico, la putrescina, el ácido valérico y el escatol (Kazor y col., 2003). De forma más  
 específica, estudios *in vitro* han demostrado que las especies bacterianas asociadas a la placa subgingival producen  
 grandes cantidades de CH<sub>3</sub>SH y H<sub>2</sub>S. Estas bacterias incluyen *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*,  
 10 *Tannerella forsythia* (anteriormente *Bacteroides forsythus*), *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*,  
*Porphyromonas endodontalis*, y especies de *Eubacterium* (Loesche y Kazor 2002; Kazor y col., 2003). La presente  
 invención usa dióxido de cloro estabilizado como bactericida, que lleva a la reducción de las bacterias orales y,  
 esencialmente, a una reducción del 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 al actuar como agente  
 desodorante (patentes de Estados Unidos con n.ºs 4689215, 4696811, 4786492, 4788053, 4792442, 4793989,  
 4808389, 4818519, 4837009, 4851213, 4855135, 4886657, 4889714, 4925656, 4975285, 5200171, 5348734,  
 15 5489435, 5618550).

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

20 Las afecciones crónicas que incluyen enfermedad periodontal, aterosclerosis, cardiopatía isquémica y diabetes,  
 comparten una característica de respuesta inflamatoria agravada. La respuesta agravada va acompañada de un  
 aumento de la producción de citocinas proinflamatorias, que aparece en respuesta a la exposición a los microbios  
 (Rose y col., 2004). Sin embargo, la respuesta inflamatoria puede dañar al tejido sano en todo el cuerpo.

25 Las infecciones periodontales estimulan al cuerpo para que segregue interleucinas y citocinas derivadas de  
 monocitos como parte del sistema de defensa inmunitario innato frente a la exposición a microbios. Las bacterias  
 gramnegativas presentes en las infecciones periodontales y en la placa dental liberan lipopolisacáridos (endotoxinas)  
 que inducen la secreción de citocinas proinflamatorias. Las infecciones periodontales pueden contribuir directamente  
 a las enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis y afecciones tromboembólicas) mediante la  
 estimulación del sistema inmunitario para que produzca citocinas proinflamatorias (Beck y col., 1996).

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

Hay evidencias 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 EE.UU. La aterosclerosis es una  
 enfermedad de los vasos sanguíneos en la que las células endoteliales que tapizan los vasos están dañadas. Las  
 lesiones endoteliales pueden ser causadas por una amplia diversidad de estímulos perjudiciales, que incluyen  
 40 hipertensión, tabaquismo, hiperlipidemia, toxinas, virus, reacciones inmunitarias 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).

45 La conexión más importante entre la cardiopatía y la enfermedad periodontal es la inflamación. La enfermedad  
 periodontal es una de las afecciones inflamatorias crónicas 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, los mediadores inflamatorios y las bacterias entran en el torrente circulatorio y viajan hacia otras  
 partes del cuerpo, tales como el corazón.

50 Briggs y col. (2006) han demostrado que la cardiopatía isquémica va asociada a una mala salud periodontal en  
 hombres de mediana edad. Este estudio midió los niveles séricos de proteína C reactiva (PCR) que se produce en el  
 hígado en respuesta a un ataque bacteriano. La PCR es un marcador no específico de la inflamación y está  
 asociada a un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular. El estudio descubrió que los hombres  
 con periodontitis tienen mayores concentraciones séricas de PCR que los individuos sin periodontitis.

55 También se ha demostrado que las infecciones periodontales son un factor de riesgo independiente para el ictus  
 isquémico (Grau y col., 2004). Estos investigadores descubrieron que el riesgo de isquemia cerebral era 4,3 veces  
 mayor en personas con periodontitis grave, en comparación con aquellas con periodontitis leves o sin periodontitis.

Se ha demostrado que la *Porphyromonas gingivalis*, un importante patógeno periodontal, tiene mayor prevalencia en placas ateroscleróticas que otras bacterias (Ford y col., 2005 y 2007). Otras bacterias encontradas a unos niveles significativamente mayores en las arterias por el estudio de Ford y col. incluían *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 inmunitaria a múltiples patógenos parece ser muy compleja (Ford y col., 2007). Los estreptococos, tales como el *Streptococcus sanguinis*, son componentes habituales de la placa dental de sitios sanos. Sin embargo, pueden provocar problemas sistémicos cuando entran en el torrente circulatorio. Herzberg y Meyer (1998) han demostrado que cuando el *S. sanguinis* se introduce en el torrente circulatorio de conejos, los animales desarrollan trombos potencialmente mortales (coágulos sanguíneos) en su sistema circulatorio. El efecto de la enfermedad periodontal sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, continúa siendo un área de investigación y son necesarios más estudios para establecer una relación de causa-efecto entre ambas.

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 tabaquismo, el alcohol, el uso de drogas y las infecciones del aparato genitourinario. Se ha investigado la relación entre las infecciones periodontales y el parto prematuro y el bajo peso al nacer, y se ha indicado que las mujeres con periodontitis tienen un mayor riesgo de resultados adversos del embarazo (Offenbacher y col., 2001; Madianos y col., 2001). El mecanismo que explica los efectos de la periodontitis sobre el nacimiento prematuro sugiere que los microbios, incluyendo lipopolisacáridos (endotoxinas), entran en la cavidad uterina durante el embarazo y estimulan la producción de citocinas (inflamación). La producción de mediadores proinflamatorios conduce a la síntesis de prostaglandinas, las cuales contraen los músculos uterinos, dilatan el cuello del útero, y provocan la ruptura prematura de las membranas (Rose y col., 2004).

Buduneli y col. (2005) descubrieron que las bacterias subgingivales siguientes: *Peptostreptococcus micros* y *Campylobacter rectus*, desempeñan ambas un papel en el aumento del riesgo de bajo peso al nacer en el parto prematuro. La exposición a las bacterias orales da como resultado la inflamación y la infección fetal, lo que aumenta aún más el riesgo de parto prematuro (Boggess y col., 2005; Offenbacher y col., 2005). También se ha descubierto que la *Fusobacterium nucleatum*, un anaerobio oral gramnegativo, está asociado a desenlaces adversos del embarazo por la colonización de las paredes de la placenta (Han y col., 2004). Se deben establecer más estudios sobre la relación entre la enfermedad periodontal y el parto prematuro y el bajo peso al nacer a fin de desarrollar una asociación estadísticamente significativa (Bassani y col., 2007).

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas en las que se produce una hiperglucemia (alto nivel de azúcar en la sangre) debido a problemas con la actividad de la insulina o la secreción de la misma. 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 una agresión ambiental, tal como determinadas infecciones víricas o reacciones autoinmunitarias. Existe una susceptibilidad genética a la enfermedad y aparece principalmente 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. Con el tiempo la hiperglucemia crónica da lugar a que el páncreas ya no pueda producir insulina. La obesidad es un factor ambiental extremadamente importante que aumenta considerablemente 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 la enfermedad periodontal debido a la respuesta deteriorada a infecciones bacterianas (García y col., 2001). Los neutrófilos (leucocitos) están funcionalmente alterados en los diabéticos quienes presentan un control metabólico deficiente. La enfermedad periodontal también se reconoce como un riesgo de agravamiento de las afecciones diabéticas.

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 lleva a una mayor producción de citocinas, 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 en comparación con sujetos sin diabetes (Nishimura y col., 2007).

El control metabólico de la diabetes está alterado en pacientes con infecciones periodontales sin tratar. Lim y col. (2007) han investigado la relación entre el control glucémico y la salud periodontal, y han descubierto que un control glucémico deficiente está claramente asociado a 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 y col., 2007). Serían necesarios estudios adicionales para demostrar la importancia de las afecciones periodontales sobre la diabetes mellitus y todos las demás afecciones sistémicas.

Las siguientes especies bacterianas, que se encuentran habitualmente en biopelículas y que son consideradas 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 microorganismos es una característica básica o particularidad de las biopelículas de la placa dental. La coagregación de las bacterias en biopelículas de placa no es un acontecimiento aleatorio, y las bacterias tienden a colonizar los dientes como grupos o en complejos. Con fines de discusión,

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 y col., 1998). Los cuatro grupos, denominados complejos azul, amarillo, verde y morado, están compuestos por colonizadores tempranos del surco subgingival. Los colonizadores tardíos asociados a comunidades microbianas complejas de biopelículas subgingivales maduras se denominan complejos naranja y rojo (Rose y col., 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 son de 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 componentes del complejo naranja reconocen y se unen a los colonizadores tempranos y promueven la colonización de las especies del complejo rojo. Estas bacterias están asociadas a la formación de "puentes" y la liberación de nutrientes en la biopelícula para que otras bacterias se unan y formen colonias. Por último, el complejo rojo consiste en tres especies: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, y *Treponema denticola*. Estas se encuentran en mayor número en sitios con enfermedad grave, fosetas profundas y lesiones avanzadas (Rose y col., 2004). Las tres especies se encuentran juntas en áreas de placa adyacentes al revestimiento epitelial del surco gingival.

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

La expresión "dióxido de cloro" se emplea ampliamente en la industria. Los expertos en la técnica conocerán las diversas formas o variaciones del mismo, las cuales están disponibles para llevar a cabo determinadas funciones y fines previstos. Además, la patente de Estados Unidos con 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 la realización de 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, empleado como tratamiento del agua potable, se obtiene a partir de clorito sódico que produce una solución carente de cloro. El dióxido de cloro estabilizado es una solución 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 a una solución que contiene dióxido de cloro estabilizado para su uso en el tratamiento de la boca en una solución, por ejemplo, en forma de colutorio o enjuague, en concentraciones inferiores a aproximadamente un 0,8 % (p/v) para el control de bacterias causantes de enfermedades, la placa bacteriana y el mal olor oral. El enjuague también se puede aromatizar mediante 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 determinado de un componente, sólido, líquido o disuelto en un disolvente, está presente en un volumen determinado de colutorio total. Las concentraciones preferentes del dióxido de cloro estabilizado en la presente invención están en el intervalo de un 0,1 % a un 2 % (p/v).

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

Inventiones 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, US 4 689 215; Madray, US 6 231 830; Richter, US 5 738 840; Witt, 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 responsables del mal olor en la boca al romper 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 Estados Unidos con n.ºs 4 851 213 y 4 889 714). En ellas se describe 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 de un 90 %. Asimismo se describe la ruptura de dobles enlaces en las glucosiltransferasas presentes en la cavidad oral.

Se indica un intervalo de concentraciones del 0,005-0,5 % (p/v) de dióxido de cloro con aproximadamente un 0,02 %-3,0 % de fosfato en la patente US 5 348 734 de Ratcliff. Este es el intervalo más alto reivindicado en la técnica anterior. La presente invención demuestra que concentraciones mayores del dióxido de cloro estabilizado son bactericidas para las bacterias orales a una velocidad mayor y en entornos microbianos más complejos que en la técnica anterior.

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

En la patente de Estados Unidos de Doyle (N.º 6 846 478) se reivindica que composiciones orales con iones clorito en una mezcla son eficaces para controlar afecciones y enfermedades bacterianas en la cavidad oral e inhiben la propagación de las bacterias en el torrente circulatorio. Además, la patente de Estados Unidos N.º 7 087 228 (Goodman) proporciona una composición para prevenir la caries dental y la endocarditis infecciosa mediante el tratamiento de la cavidad oral para eliminar bacterias, incluyendo *Streptococcus mutans*. Sin embargo, estas invenciones no son específicas con respecto al dióxido de cloro estabilizado como principio activo para la prevención y el tratamiento de enfermedades orales debidas a afecciones bacterianas polimicrobianas en la cavidad oral.

La enfermedad periodontal proviene de la respuesta 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 inmunitario 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 que existe una considerable destrucción bacteriana e inhibición del desarrollo de la placa bacteriana sobre tales entornos microbianos. La presente invención tiene en cuenta la diversa ecología natural e investiga las propiedades bactericidas y bacteriostáticas en suspensiones microbianas mixtas de muchas bacterias orales implicadas en las enfermedades periodontales. Las invenciones previas y la investigación anterior implicaban la investigación de cultivos de bacterias individuales en suspensión, que no representan de forma precisa la ecología oral natural.

Se observan pruebas que respaldan las propiedades antimicrobianas de la presente invención en el estudio de Botha y Molobela sobre la inhibición de organismos orales individuales con un comprimido de dióxido de cloro concentrado (2006). El estudio concluía que el dióxido de cloro era un agente antibacteriano eficaz cuando se ensayaba contra los siguientes patógenos orales: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. (forsythensis) forsythia*, y *E. corrodens*. Las susceptibilidades variaban según los diferentes organismos, pero se observó ciertamente una 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 respalda estos descubrimientos y es una extensión hacia un enfoque global de representación de la ecología oral como un entorno diverso. El documento EP 0 613 678 (de Micropure) describe una composición basada en una solución de dióxido de cloro estabilizada en forma de una composición de colutorio o dentífrico.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una solución para su uso tal como se expone en las reivindicaciones. Se usa una solución que contiene dióxido de cloro estabilizado como colutorio en concentraciones en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,8 % (p/v) para el control de bacterias causantes de enfermedades, la placa bacteriana y el mal olor oral. Las propiedades bactericidas incluyen la destrucción de bacterias orales gramnegativas anaerobias/aerobias/facultativas y bacterias orales grampositivas anaerobias/aerobias/facultativas que aparecen en comunidades microbianas mixtas. El colutorio no solo es eficaz en la destrucción de muchos patógenos periodontales expuestos al mismo, sino que también ralentiza o previene la recolonización de bacterias orales a lo largo del tiempo.

Por tanto, un objeto principal de la presente invención es proporcionar dióxido de cloro estabilizado para su uso como colutorio a fin de reducir la placa y la producción de mal olor oral.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un colutorio que tiene dióxido de cloro estabilizado en una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,8 % (p/v) para su uso en la

creación de una interferencia bacteriostática y bactericida con el crecimiento de patógenos periodontales grampositivos y gramnegativos presentes en las biopelículas de placa dental.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar dióxido de cloro estabilizado en un colutorio para su uso en la destrucción de bacterias en una comunidad microbiana mixta dentro de la cavidad oral.

- 5 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar dióxido de cloro estabilizado en un colutorio para su uso en la destrucción de bacterias gramnegativas anaerobias/aerobias/facultativas y bacterias orales grampositivas anaerobias/aerobias/facultativas de la cavidad oral.

10 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un colutorio que tiene dióxido de cloro estabilizado en una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 0,8 % (p/v) para su uso en la prevención de una enfermedad oral mediante sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas.

Estos y otros objetos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a medida que procede la descripción de la misma.

### **Breve descripción de las figuras**

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

15 La Figura 1 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral sin aromatizar con una concentración del 0,1 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta;

20 La Figura 2 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a agua destilada (control) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación, que sirve como control negativo para comparación con el enjuague oral con una concentración del 0,1 % de la Figura 1;

La Figura 3 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral sin aromatizar con una concentración del 0,4 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta;

25 La Figura 4 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral sin aromatizar con una concentración del 0,5 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta;

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

30 La Figura 6 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral aromatizado con una concentración del 0,5 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta (Nótese la reaparición de un recuento de *F. nucleatum* en la exposición 3, este podría deberse a la resistencia bacteriana o a un error técnico);

35 La Figura 7 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a agua destilada (control) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta, que sirve como comparación con el enjuague oral aromatizado con una concentración del 0,5 % (p/v) mostrado en la Figura 6;

La Figura 8 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral aromatizado con una concentración del 0,6 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta;

40 La Figura 9 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral sin aromatizar con una concentración del 0,6 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta, y muestra también la comparación entre el enjuague y los controles (dH<sub>2</sub>O y ETSB-YE);

45 La Figura 10 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral aromatizado con una concentración del 0,8 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta; y muestra también una comparación entre el enjuague y los controles (dH<sub>2</sub>O y ETSB-YE);

La Figura 11 muestra la viabilidad bacteriana tras exposiciones de un (1) minuto a un enjuague oral sin aromatizar con una concentración del 0,8 % (p/v) tras 0 horas, 17 horas y 36 horas de incubación frente a una suspensión bacteriana mixta; y muestra también una comparación entre el enjuague y los controles (dH<sub>2</sub>O y ETSB-YE); y

50 La Figura 12 muestra la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) tras exposiciones de un (1) minuto al enjuague oral sin aromatizar (concentración de ensayo T<sub>0</sub> = 10<sup>8</sup>); los controles incluidos en

este ensayo son clorhexidina, caldo de cultivo neutralizante, dH<sub>2</sub>O, y caldo de cultivo Pg (*Porphyromonas gingivalis*).

### Descripción realización preferente

5 La presente invención se refiere a soluciones para el cuidado oral que incluyen colutorios o enjuagues orales en una solución que comprende dióxido de cloro estabilizado. Contempla el uso de dióxido de cloro estabilizado como agente bactericida y bacteriostático frente a microorganismos implicados en enfermedades orales tales como, si bien no se limitan a los mismos, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus* y *A. viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros*, *Streptococcus sanguinis* y *S. oralis*, *Campylobacter rectus*, y *Enterococcus faecalis*. El mecanismo para dicha composición incluye la determinación de la actividad bactericida del dióxido de cloro estabilizado frente un espectro de bacterias orales, como bacterias individuales y como comunidades polimicrobianas, asociadas a las enfermedades periodontales y la salud.

15 La presente invención consiste en una solución de dióxido de cloro estabilizado para su uso como bactericida y/o bacteriostático sobre comunidades de bacterias orales en un intervalo de concentraciones del 0,1 %-0,8 % (p/v). Tiene el efecto de destruir y reducir el número de bacterias gramnegativas y grampositivas a concentraciones mayores que las conocidas en la técnica anterior. Este efecto era inesperado, puesto se creía que mostraría una relación lineal en la cantidad de bacterias destruidas. Sin embargo, se ha descubierto que se produce una velocidad exponencial de destrucción bacteriana en los estudios *in vitro*. Se supone que a una concentración del 0,2 % (p/v), la velocidad de destrucción debería de ser el doble que a la concentración del 0,1 % (p/v), según se determina en una relación lineal. Esta correlación no se observó en los ensayos realizados como evidencia de la presente invención. Parece haber un efecto exponencial sobre los microorganismos a medida que aumenta la concentración del dióxido de cloro estabilizado.

25 La presente invención establece la cinética bactericida de las características antimicrobianas del dióxido de cloro estabilizado frente a comunidades bacterianas mixtas a un intervalo de concentraciones del 0,1-0,8 % (p/v). La estrategia experimental de evaluar las bacterias como una comunidad y no como una entidad individual es importante debido a que 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 destrucción bacteriana en entornos similares a la placa o en suspensiones polimicrobianas, tal como se ha efectuado en la experimentación. Este entorno reduce la susceptibilidad a antimicrobianos y hace que sea más difícil controlar y evitar la progresión a condiciones patológicas.

30 La presente invención 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 la progresión de las enfermedades orales y la periodontitis. Cuando se suspende en un cultivo polimicrobiano de múltiples especies de bacterias orales, la solución destruye y reduce el recrecimiento de las bacterias orales asociadas a enfermedades orales y bacterias oportunistas, incluyendo aquellas asociadas a la salud, más específicamente a bacterias orales gramnegativas anaerobias/aerobias/facultativas y bacterias orales grampositivas anaerobias/aerobias/facultativas.

40 La presente invención reivindica el uso del enjuague oral de dióxido de cloro estabilizado 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 frente a las bacterias orales implicadas en las enfermedades periodontales. Por ejemplo, se ha demostrado en la presente invención que el recrecimiento de *P. gingivalis* fue inhibido, lo cual demuestra un efecto bacteriostático sobre este patógeno periodontal gramnegativo específico. Existe poca o ninguna investigación o técnica anterior 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 causa efectos bacteriostáticos sobre las células bacterianas que finalmente conducen a la muerte celular. Esta inhibición del metabolismo celular y la función celular inhibe o controla eficazmente la formación de la placa bacteriana y los compuestos de azufre volátiles responsables del mal olor, los principales contribuyentes de la enfermedad oral y la formación de la placa.

50 El mecanismo específico por 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 presente invención 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 procesos metabólicos inhibidos. Debido a estos efectos sobre las bacterias, la producción de placa y la progresión a enfermedades orales pueden ser inhibidas mediante enjuagado con una solución del dióxido de cloro estabilizado en un intervalo de concentraciones del 0,1 % al 0,8 % (p/v). La producción de compuestos responsables de mal olor oral (VSC) también se puede inhibir. Los siguientes mecanismos de acción concretan las explicaciones de la destrucción bacteriana por el dióxido de cloro.

El mecanismo de acción específico del dióxido de cloro sobre las células se ha debatido durante años. Las investigaciones tempranas demostraron que el principal efecto del dióxido de cloro era la alteración de la síntesis de proteínas, lo cual conduce a la muerte celular (Benarde y col., 1967). Los resultados de los estudios de Benarde

demuestran claramente una inhibición súbita 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 (lo que provoca una pérdida del contenido celular por escape).

5 Sin embargo, un estudio posterior indicaba que puede que este no fuera el caso. Roller y col. estudiaron los efectos del dióxido de cloro sobre enzimas deshidrogenasas, la síntesis de proteínas y el ácido desoxirribonucleico de bacterias (Roller y col., 1986). Los resultados demostraron 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 usada era proporcional al  
10 grado de inhibición. Estos estudios concluían que el principal efecto del dióxido de cloro sobre las células estaba sucediendo en un área de la célula distinta a la 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, contribuía a la muerte celular. Sin embargo, Roller y col. concluyeron que se estaba produciendo una alteración de las funciones de la célula incluso antes de la síntesis de proteínas. Se demostró que el dióxido de cloro no provocaba la inactivación  
15 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 que son debidas a una reacción con componentes, o una oxidación de los mismos, relacionados con la actividad enzimática de la célula (Roller y col., 1986).

Un estudio más reciente sobre el mecanismo de acción del dióxido de cloro fue llevado a cabo por Berg y col., (1986). Berg y col. estudiaron el efecto del dióxido de cloro sobre las funciones de membrana de *Escherichia coli* y descubrieron que el control de la permeabilidad estaba deteriorado, conduciendo a la muerte celular. También se demostró que la inactivación por el dióxido de cloro no causa 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 a través de la membrana, que se cree que lleva a la inhibición letal de los procesos metabólicos y a la muerte celular. Así, se determinó que la barrera de permeabilidad de la célula era importante para la sensibilidad al dióxido de cloro y las características de crecimiento de la célula.

La evidencia de la presente investigación sugiere 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 llevar a un control sobre la formación de la placa bacteriana y los compuestos de azufre volátiles responsables del mal olor, los principales contribuyentes de 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 soluciones con las concentraciones especificadas (intervalo de concentraciones de un 0,1 %-0,8 % (p/v)) en ensayos *in vitro* que contenían la bacteria. Las experimentaciones incluyeron el ensayo de soluciones de enjuague oral aromatizadas y sin aromatizar.

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

**Materiales:**

*Actinomyces viscosus* ATCC 43146  
*Actinomyces odontolyticus* ATCC 17929  
40 *Campylobacter rectus* ATCC 33238  
*Enterococcus faecalis* ATCC 10741  
*Fusobacterium nucleatum* ATCC 49256  
*Micromonas (Peptostreptococcus) micros* ATCC 33270  
*Porphyromonas gingivalis* ATCC 49417  
45 *Prevotella intermedia* ATCC 25611  
*Streptococcus sanguinis* ATCC 10556  
*Streptococcus oralis* ATCC 35037

Enjuague oral con agente aromatizante  
Enjuague oral sin agente aromatizante  
50 Caldo de cultivo neutralizante Difco® (~ 800 ml)  
TSBYE enriquecido (~ 400 ml)  
Saliva artificial + triptona al 5 % + extracto de levadura al 5 % (~ 2500 ml) (AS+T+Y)

0,147 g/l de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)  
0,426 g/l de fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
55 1,68 g/l de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>)

Tubos de centrifuga de 90-50 ml  
Pipetas de 25 ml, 10 ml, 5 ml, y 0,1 ml  
Pipeteador

9 matraces Erlenmeyer estériles  
 Tubos de ensayo estériles  
 39 de cada agar selectivo para un total de 312 placas (reducido previamente durante 48 h)  
 Medio de crecimiento óptimo y agares selectivos (el medio se redujo previamente durante 24 h)

- 5 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*  
 10 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

Agar sangre

15 La determinación de la actividad bactericida del enjuague de dióxido de cloro estabilizado se realizó con suspensiones de bacterias orales individuales que están asociadas a 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*.

20 Los organismos usados en los experimentos son aislados de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) y se obtuvieron originariamente de infecciones orales. Todas las bacterias están permanentemente almacenadas como una crioteca a -90 °C.

25 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 recogieron mediante centrifugación y se lavaron 2 veces en medio estéril previamente reducido. Las células se suspendieron en medio estéril previamente reducido y se ajustaron a concentraciones normalizadas basándose en curvas patrón de concentración celular y absorbancia mediante espectroscopía.

30 Los ensayos bactericidas se realizaron en un sistema de placas de microtitulación. Los componentes del ensayo consistían en suspensiones bacterianas normalizadas, con unas concentraciones celulares de partida de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> UFC/ml, diluciones antimicrobianas, y medios estériles. Se empleó un intervalo de concentraciones de enjuague, diluido en agua destilada estéril. Los controles positivos consistían en un 0,12 % de clorhexidina, y los controles negativos eran agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O). En una serie de operaciones, se incluyó también el agente aromatizante en el ensayo.

35 Las placas de microtitulación se incubaron en una cámara anaerobia entre los momentos del ensayo. Las muestras se retiraron en diferentes periodos de tiempo y se procesaron para determinar el número de células viables mediante una metodología de siembra de placas en espiral empleando un sistema Spiral Plate 4000. El sistema de placas en espiral se utilizó 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.

40 Los recuentos microbianos sin procesar se transformaron inicialmente en valores de log<sub>10</sub> para normalizar los datos antes de realizar el análisis estadístico. Esta es una práctica convencional y es usada ampliamente 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 obtenían varianzas desiguales, los datos se analizaban también mediante un ANOVA de Kruskal-Wallis no paramétrico. En el primer caso, si se observaba una significación estadística, se realizaban pruebas de Tukey-Kramer posteriores para determinar las diferencias entre los grupos. En el último caso, se realizaron pruebas de comparación múltiple de Dunn. La significación estadística se ajustó a  $\alpha = 0,05$ . Los datos se analizaron mediante un ensayo t de Student.

50 Se observó una tendencia general entre los anaerobios gramnegativos, estas bacterias eran más susceptibles al enjuague de dióxido de cloro estabilizado con una concentración del 0,1 % (p/v) (datos no mostrados). Se observó una reducción del número de células viables después de una exposición de 1 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 destrucción completa del inóculo en los experimentos con una exposición de 10 minutos.

55 Se observó un perfil de susceptibilidad ligeramente diferente con *Prevotella intermedia*, una bacteria gramnegativa anaerobia. Se observaron disminuciones estadísticamente significativas en el número de células viables con una exposición de 1 minuto y una de 5 minutos, produciéndose la destrucción completa a los 5 minutos.

Los resultados de los experimentos con *Campylobacter rectus* indican que una exposición de 1 minuto a concentraciones del enjuague oral da como resultado reducciones estadísticamente significativas en el número de

células viables en el ensayo. El enjuague oral producía una destrucción de > 95 % con una exposición de 1 minuto con respecto a *Campylobacter rectus* (anaerobio gramnegativo).

5 En conclusión, el enjuague oral ha mostrado unos fuertes efectos sobre la viabilidad bacteriana para bacterias orales gramnegativas anaerobias. Además, estas bacterias se ensayaron en mezclas polimicrobianas, que están asociadas al desarrollo y la progresión de enfermedades periodontales e infecciones.

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

10 El fin de este experimento era 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 variaban del 0,1 % al 0,8 % (p/v). Se detallan los siguientes procedimientos para una concentración de enjuague oral del 0,4 % (p/v) que se modificó, por tanto, para otras concentraciones ensayadas, que incluyen concentraciones del 0,1 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, y 0,8 % (p/v).

15 El ensayo realizado era similar al llevado a cabo para las bacterias individuales, solo que el enjuague oral se evaluó frente a suspensiones bacterianas mixtas. Cada uno de los organismos bacterianos (0,1 ml para aerobios y 0,5 ml para anaerobios) se inoculó en 50 ml de medio de crecimiento óptimo y se incubó durante 24 horas (aerobios) y 48 horas (anaerobios). Tras haber finalizado el periodo de incubación, 25 ml de las soluciones madre bacterianas se centrifugaron a 7500 veces la gravedad (7500 x g) durante 10 minutos y se resuspendieron en 25 ml de ETSBYE. Se realizaron dos diluciones a  $10^{-2}$  a partir de estas resuspensiones en ETSBYE (0,1 ml de resuspensión en 10 ml de ETSBYE). La segunda de las diluciones se sembró en placa sobre agar sangre para obtener un recuento de UFC/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 se diluyó después a  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  y se sembró en placa en espiral sobre agar sangre y agar CVE.

25 La siguiente tabla muestra el volumen de cada bacteria añadida para crear 35 ml de una suspensión de cultivo mixto a  $1,2 \times 10^8$  UFC/ml. Una vez creada la suspensión mixta, la suspensión se diluyó a  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  y se sembró 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 ( $\sim 1 \times 10^6$ )	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	0,238*
<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 era tan baja porque las bacterias se habían adherido al fondo del matraz. El fondo del matraz se raspó con un asa estéril para permitir la suspensión de las mismas, y se descubrió que los recuentos de UFC/ml para el ensayo eran los esperados.

\*\*--- la concentración parecería ser el doble por la A660 aunque, según la curva patrón, había una minúscula diferencia y, por tanto, el experimento se realizó como se había calculado previamente.

30 Los tubos de enjuague oral aromatizado y sin aromatizar se ensayaron por triplicado juntos, y los tubos con dH<sub>2</sub>O y ETSBYE (controles) se ensayaron por triplicado juntos. Cada tubo se preparó tal como sigue: se añadió la suspensión bacteriana, y el tubo de centrifuga se agitó con formación de 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 se agitó después con formación de vórtice durante 30

segundos. Los tubos se redujeron y después se centrifugaron a 8000 x g durante diez minutos. El sobrenadante se retiró y se añadieron 44 ml de AS+T+Y reducido previamente. A continuación se centrifugaron los tubos a 8000 x g durante diez minutos más. El sobrenadante se retiró de nuevo y se añadieron 3 ml de AS+T+Y. Se realizaron diluciones a  $10^{-2}$  y se cultivaron en espiral sobre los agares selectivos. Los tubos se incubaron después de forma anaerobia en una incubadora a 37 °C durante 17 horas y se repitió el proceso. Este proceso se realizó a las 0 horas, 5 17 horas y 36 horas.

Al igual que en los ensayos realizados previamente, las placas de microtitulación se incubaron en una cámara anaerobia entre los momentos del ensayo. Las muestras se retiraron en diferentes periodos de tiempo y se procesaron para determinar el número de células viables mediante una metodología de siembra de placas en espiral empleando un sistema Spiral Plate 4000. 10

Los análisis estadísticos se efectuaron del mismo modo que para los estudios de suspensión de bacterias individuales, descritos anteriormente.

Los resultados para el efecto del enjuague oral con una concentración del 0,1 % (p/v) frente a las suspensiones polimicrobianas se muestran en la Figura 1. La destrucción completa de *C. rectus*, un patógeno periodontal anaerobio gramnegativo, se produjo después de la segunda exposición (17 horas) al enjuague oral con una concentración del 0,1 % (p/v). También se observaron reducciones significativas del número de células viables de las otras bacterias ensayadas, que incluían *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 destrucción 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 destrucción completa de *C. rectus* y *P. gingivalis* después de la segunda exposición (datos no mostrados). 15 20

A una concentración del 0,1 % (p/v) del enjuague oral, las bacterias grampositivas normalmente asociadas a 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 destrucción completa de todos los organismos gramnegativos y grampositivos tan solo después de la segunda exposición. 25

Los resultados indicaban que los patógenos periodontales gramnegativos anaerobios en suspensiones polimicrobianas eran muy susceptibles a múltiples exposiciones breves al enjuague oral de dióxido de cloro estabilizado. El enjuague oral al 0,4 % (p/v) mostraba una actividad bactericida muy fuerte, que producía reducciones significativas en los niveles de todas las bacterias dentro de la suspensiones polimicrobianas, tal como se muestra en la Figura 3. Más específicamente, solo cuatro bacterias grampositivas sobrevivieron a la primera exposición al enjuague oral (*S. sanguinis*, *E. faecalis*, *S. oralis*, *A. viscosus*). De forma importante, los anaerobios gramnegativos, tales como *Porphyromonas gingivalis*, *F. nucleatum*, y *C. rectus*, fueron completamente eliminados después de la primera exposición al enjuague oral. 30

El nivel de actividad bactericida con el enjuague al 0,3 % (p/v) era muy similar al enjuague con una concentración del 0,1 % (p/v) (datos no mostrados). Se cree que este hecho es un efecto exponencial de destrucción de las bacterias del enjuague oral, porque se produjo un aumento brusco en la viabilidad bacteriana en respuesta al enjuague oral a concentraciones del 0,4 % (p/v) y superiores. 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 una concentración del 0,5 % de dióxido de cloro estabilizado, con y sin el agente aromatizante, los resultados de destrucción completa de todas las bacterias en la suspensión polimicrobiana tras 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 al cabo de 17 horas; estas dos bacterias eran *E. faecalis* (bacteria anaerobia grampositiva) y *A. viscosus* (bacteria aerobia grampositiva). Los resultados obtenidos de las exposiciones al dióxido de cloro estabilizado se pueden comparar con los controles de exposición al agua destilada mostrados en las Figuras 5 y 7 a fin de comparar y observar claramente las diferencias significativas. 35 40 45

Las Figuras 8 a 11 muestran la actividad bactericida del enjuague oral a las concentraciones del 0,6 % y 0,8 % (p/v) con y sin el agente aromatizante (aromatizado y sin aromatizar). El enjuague oral concentrado al 0,6 % destruye totalmente todas las bacterias en la suspensión bacteriana mixta tras una primera exposición en el enjuague oral sin aromatizar. La única bacteria que sobrevivió a la primera exposición en el enjuague oral aromatizado fue *A. viscosus*, una bacteria grampositiva. Sin embargo, esta bacteria fue destruida tras la segunda exposición 17 horas después. Los controles de dH<sub>2</sub>O y ETSB-YE también se muestran en parte con el enjuague oral al 0,6 %, tal como se ilustra en la Figura 9. Se podía observar que había células vivas en los controles. 50

A la máxima concentración ensayada, el 0,8 % (p/v), no hubo señales de bacterias vivas después de la primera exposición en los enjuagues orales aromatizados y en los no aromatizados, tal como se muestra en las Figuras 10 y 11, respectivamente. De nuevo, los controles en ambas figuras se pueden comparar con el enjuague oral. 55

En conclusión, los enjuagues orales de dióxido de cloro estabilizado concentrados, con una concentración de hasta un 0,8 % (p/v), poseen un alto nivel de actividad bactericida que se dirige a anaerobios gramnegativos y

5 aerobios/anaerobios grampositivos. Los resultados demuestran una relación funcional de etapas crecientes entre el efecto bactericida y la concentración del enjuague oral. Existe un aumento significativo de la destrucción bacteriana en una suspensión polimicrobiana a una concentración del 0,4 % y superior. Un aumento lineal no parece ser el caso debido al cambio en el efecto de las concentraciones del 0,1 % y el 0,3 % con respecto a la concentración del 0,4 % del enjuague oral sobre la destrucción de las bacterias orales.

10 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*. Se expusieron suspensiones de *Porphyromonas gingivalis*, ajustadas a una concentración de ensayo de  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml, a la concentración del 0,1 % (p/v) del enjuague oral durante un minuto. Las suspensiones se diluyeron inmediatamente en medio nuevo y después se incubaron a 37 °C en una cámara anaerobia.

15 La evidencia sugiere 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 implicarían que es una disolución eficaz para prevenir la degradación de sustratos proteínicos exógenos y endógenos, epitelio oral, restos de comida y saliva. De forma más importante, esto limitaría la producción de placa dental y compuestos de azufre volátiles.

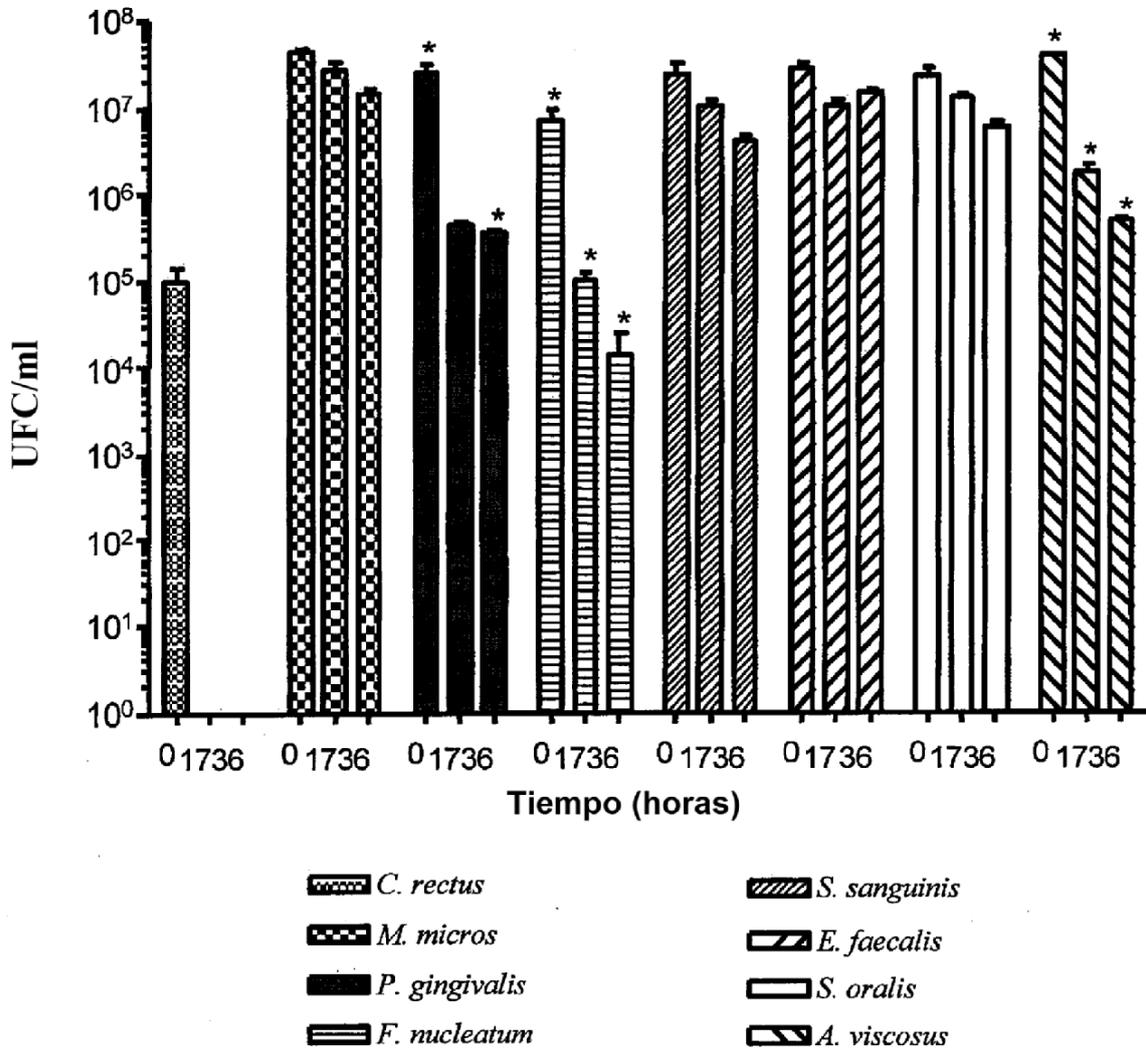
20 Las células expuestas a agua destilada o a medio nuevo muestran una cinética de crecimiento normal, alcanzando una alta absorbancia a las 36 horas de incubación. Sin embargo, las células expuestas al enjuague oral, aromatizado o sin aromatizar, no fueron capaces de crecer a lo largo de un periodo de 48 horas. Este efecto se observó con *P. gingivalis* a  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml. La inhibición del crecimiento de *P. gingivalis* se muestra en la Figura 12 como resultado del enjuague oral sin aromatizar a una concentración del 0,1 % (p/v). Basándose en los datos obtenidos, se observó que una breve exposición al enjuague oral tiene un efecto bacteriostático significativo sobre el patógeno periodontal gramnegativo *Porphyromonas gingivalis*. Se cree que también tiene un efecto sobre las otras bacterias orales.

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una solución de dióxido de cloro estabilizado que tiene una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % (p/v) a aproximadamente un 0,8 % (p/v) para su uso en la provocación de una interferencia bacteriostática y/o bactericida con el crecimiento de patógenos periodontales gramnegativos y grampositivos presentes en mezclas polimicrobianas de la cavidad oral.
2. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para crear una interferencia bacteriostática y bactericida con el crecimiento de bacterias anaerobias y aerobias en mezclas polimicrobianas asociadas a las enfermedades periodontales.
- 10 3. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para interferir con la producción de proteínas a fin de influir negativamente en el crecimiento de patógenos periodontales gramnegativos y grampositivos.
4. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para interferir con la producción de al menos uno de ADN y ARN a fin de influir negativamente en el crecimiento de patógenos periodontales gramnegativos y grampositivos.
- 15 5. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para influir en la capacidad de las células bacterianas para mantener el control de la permeabilidad de la membrana.
6. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para reducir al menos la presencia de patógenos periodontales gramnegativos que incluyen cualquiera de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, y *Campylobacter rectus*, en mezclas polimicrobianas de la cavidad oral.
- 20 7. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para reducir al menos la presencia de bacterias periodontales grampositivas en mezclas polimicrobianas que incluyen cualquiera de *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Micromonas (Peptostreptococcus) micros*, y *Enterococcus faecalis*.
- 25 8. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para conseguir principalmente efectos bacteriostáticos sobre el crecimiento de patógenos periodontales en una mezcla polimicrobiana de bacterias gramnegativas y grampositivas, en la que la concentración de dióxido de cloro estabilizado está el intervalo del 0,1 % (p/v) al 0,3 % (p/v).
9. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para conseguir principalmente efectos bactericidas sobre patógenos periodontales en una mezcla polimicrobiana de bacterias gramnegativas y grampositivas, en la que la concentración de dióxido de cloro estabilizado está el intervalo del 0,4 % (p/v) al 0,8 % (p/v).
- 30 10. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las propiedades bacteriostáticas y bactericidas son debidas a la inhibición de la síntesis de proteínas y/o a la incapacidad de la célula bacteriana para mantener el control de la permeabilidad de la membrana, y procesos metabólicos inhibidos.

Figura 1



\*significativamente diferente p < 0,05

Figura 2

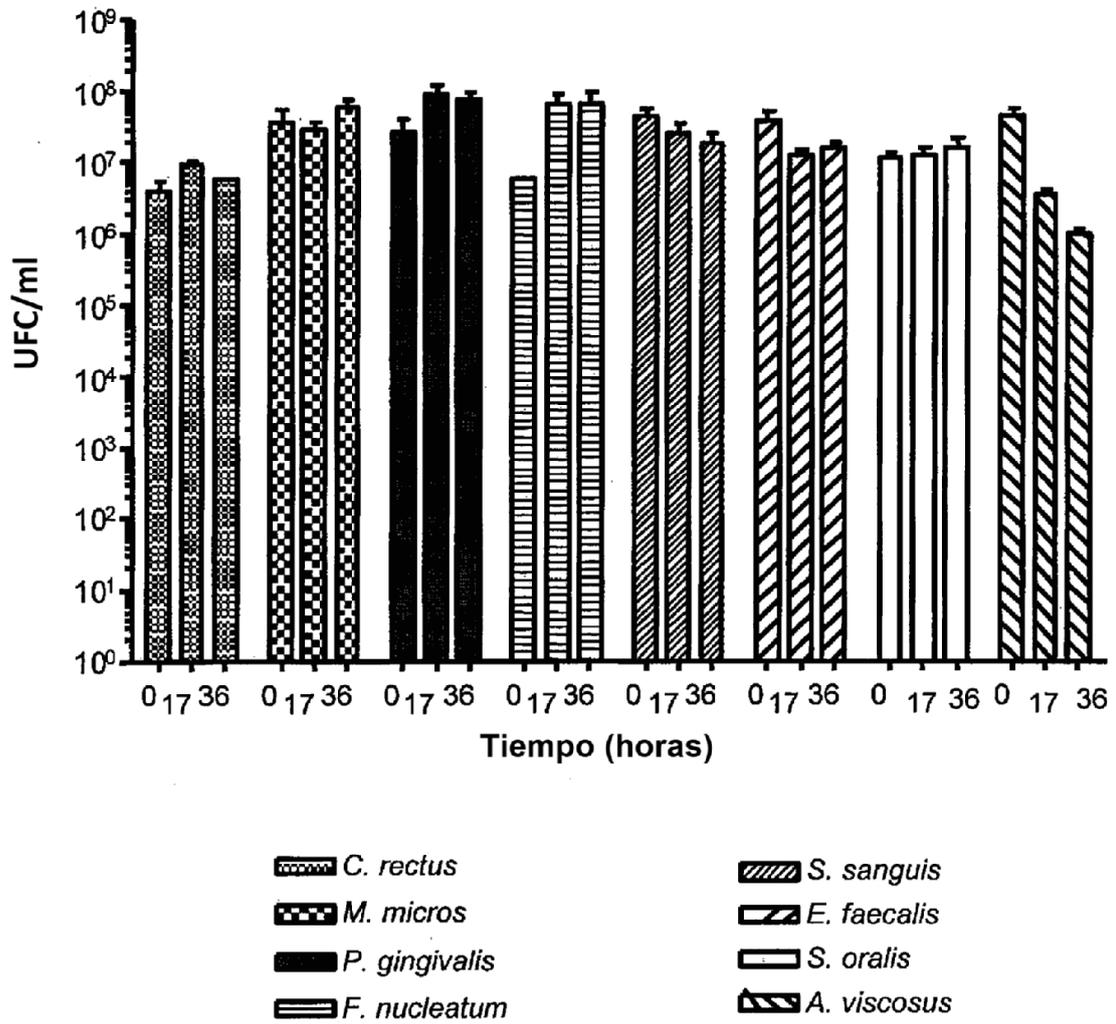
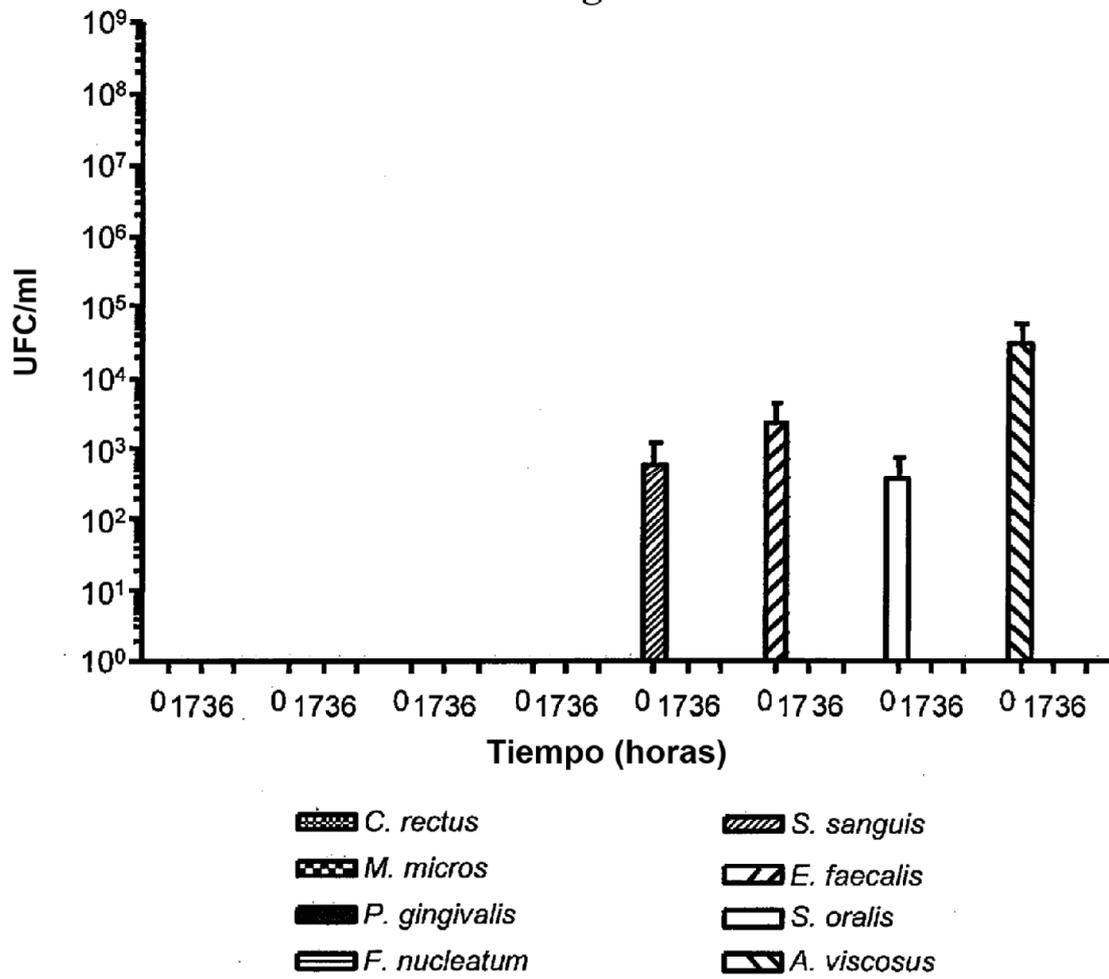
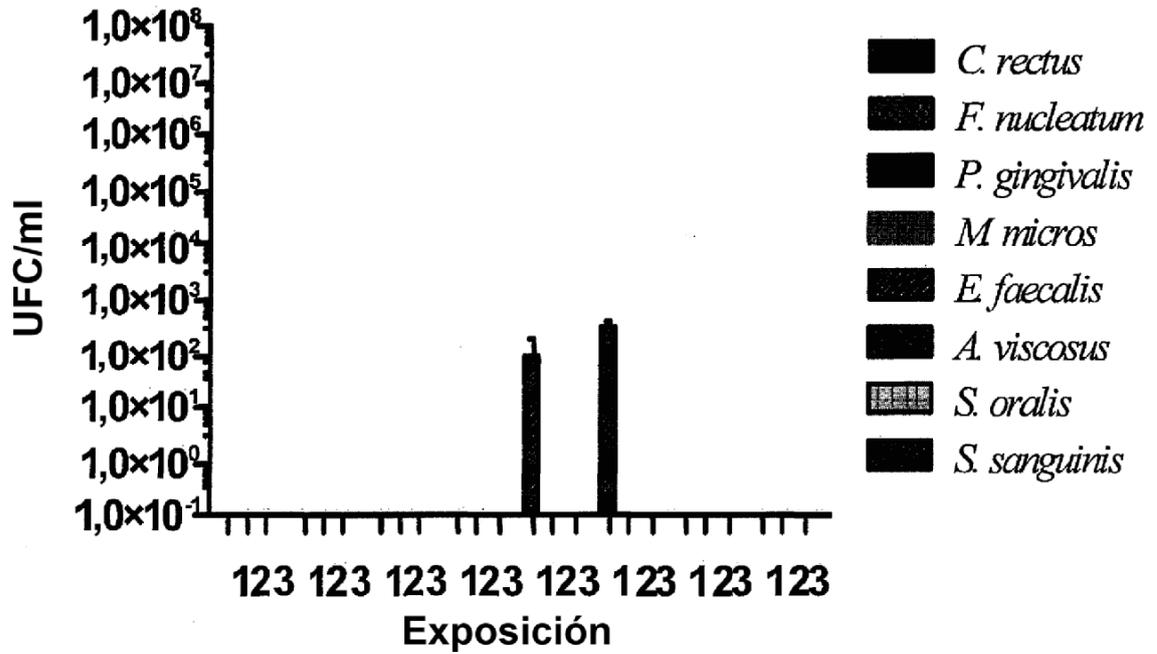


Figura 3

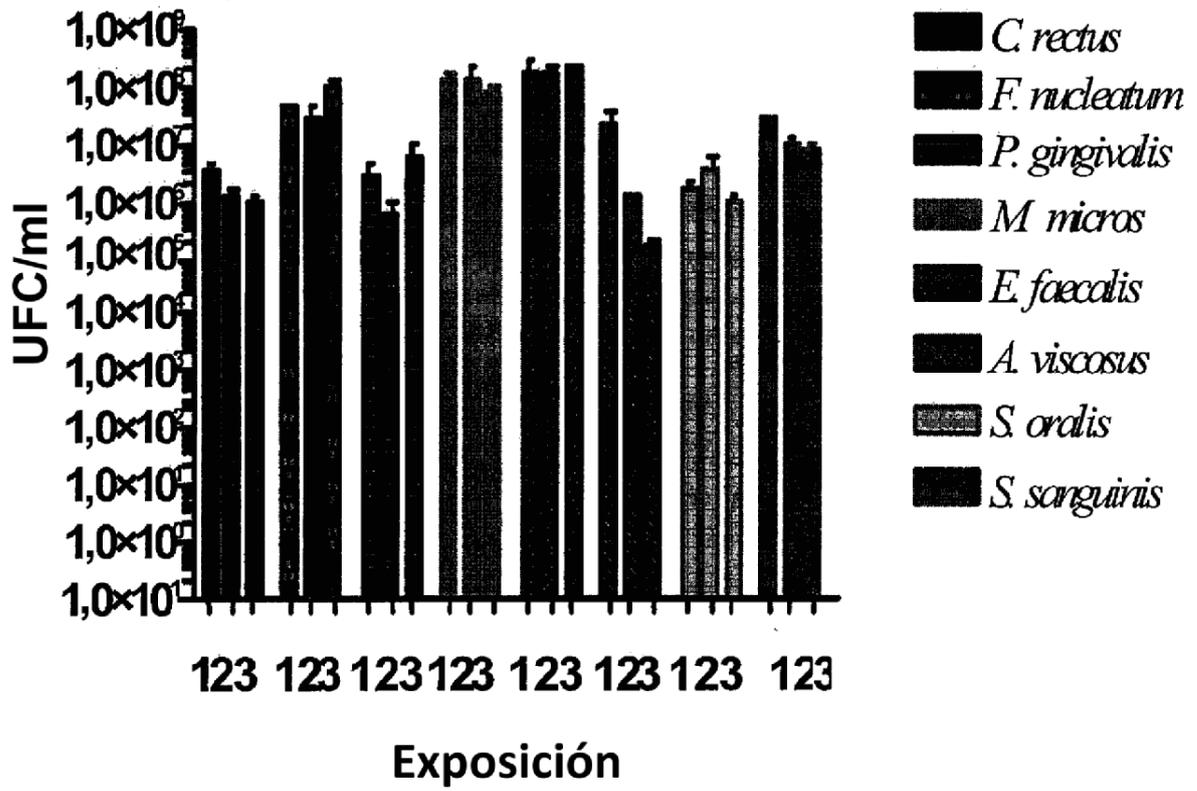


**Figura 4**



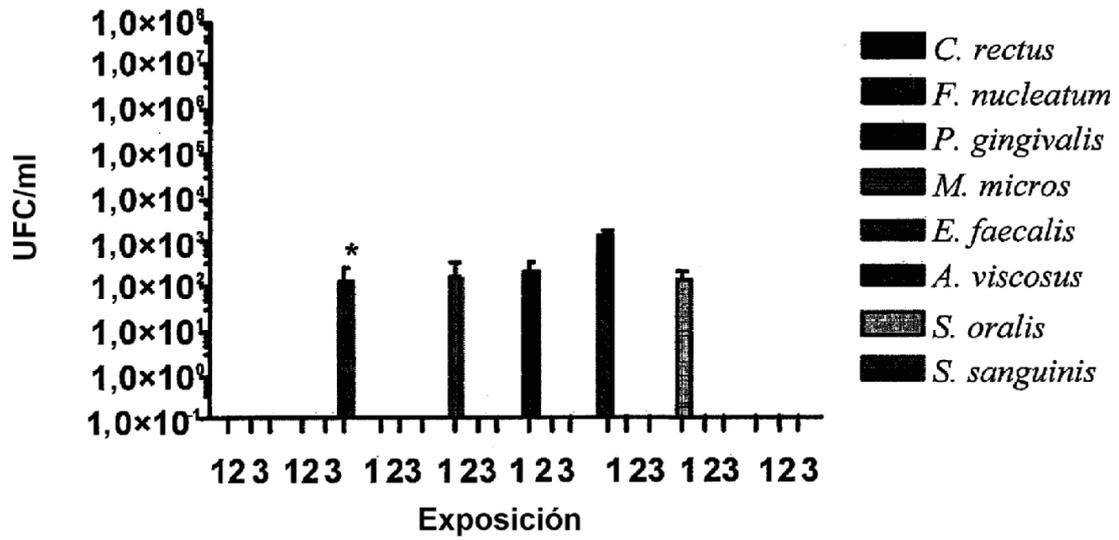
Exposición 1 = Tiempo 0  
Exposición 2 = 17 horas  
Exposición 3 = 36 horas

**Figura 5**



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

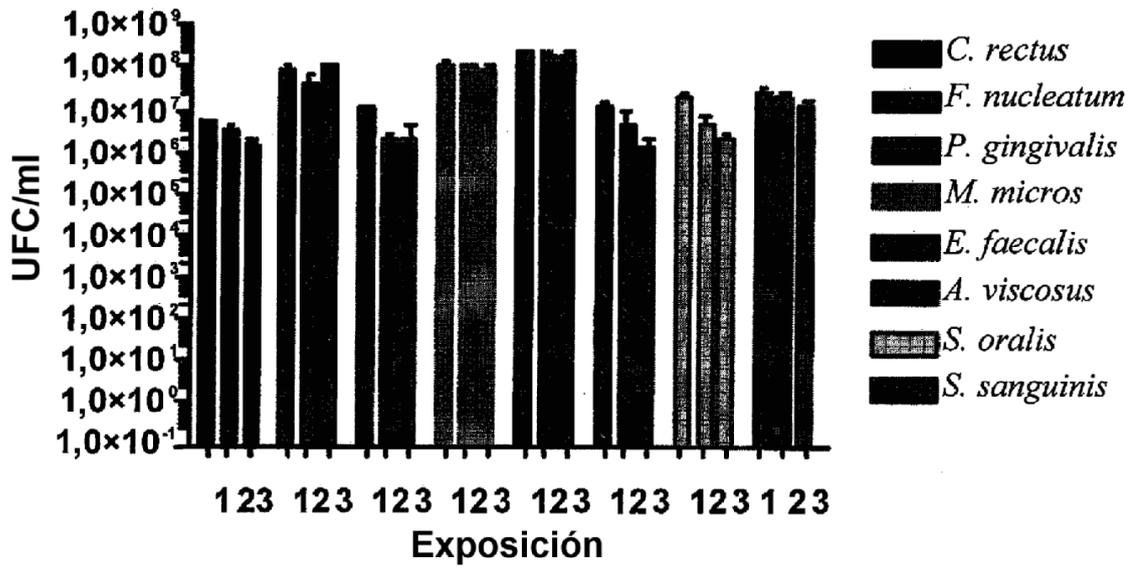
**Figura 6**



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

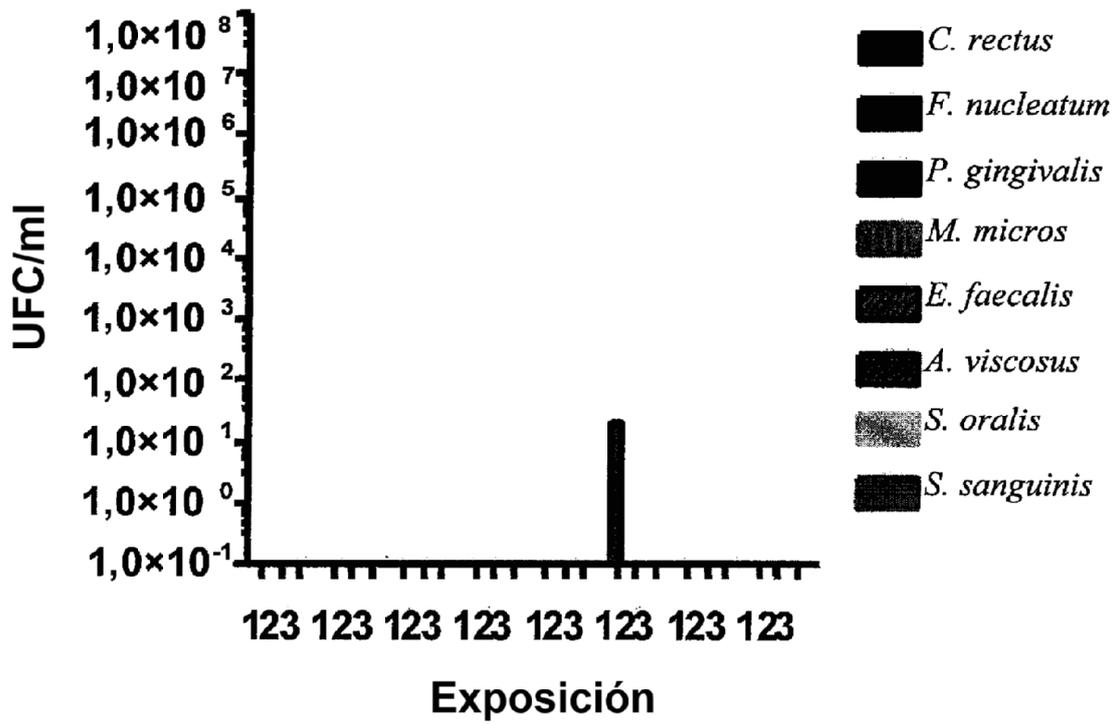
\* La reaparición de recuentos bacterianos en este momento podría deberse al desarrollo de resistencia bacteriana o al resultado de un error técnico.

Figura 7



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

**Figura 8**



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

**Figura 9**

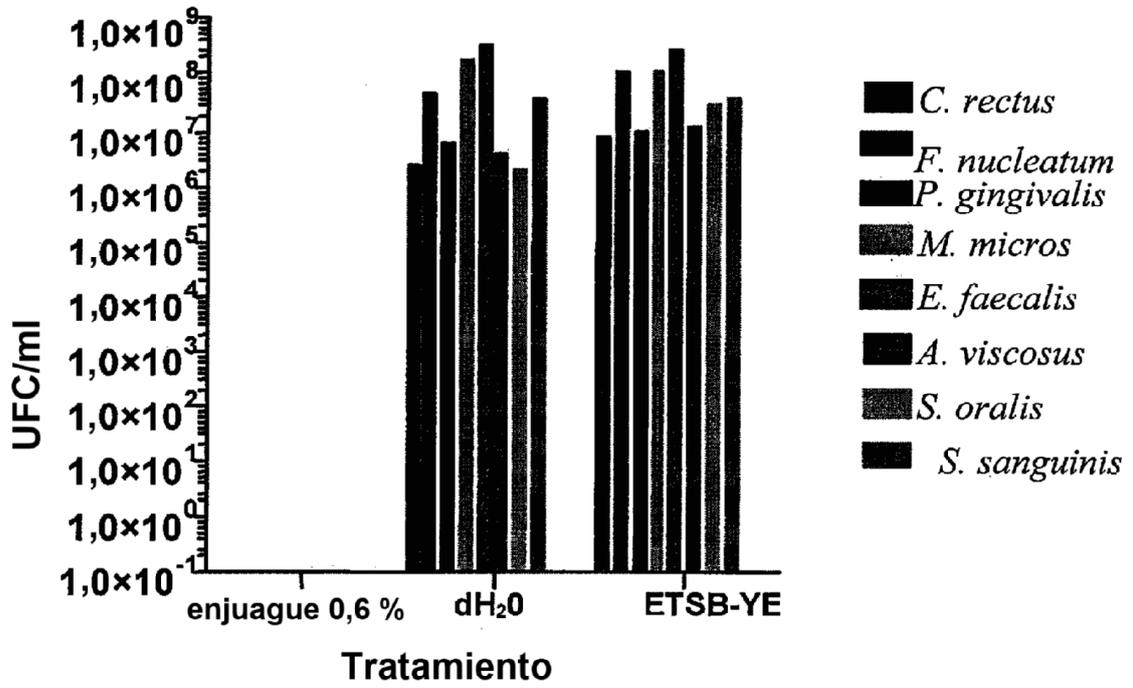


Figura 10

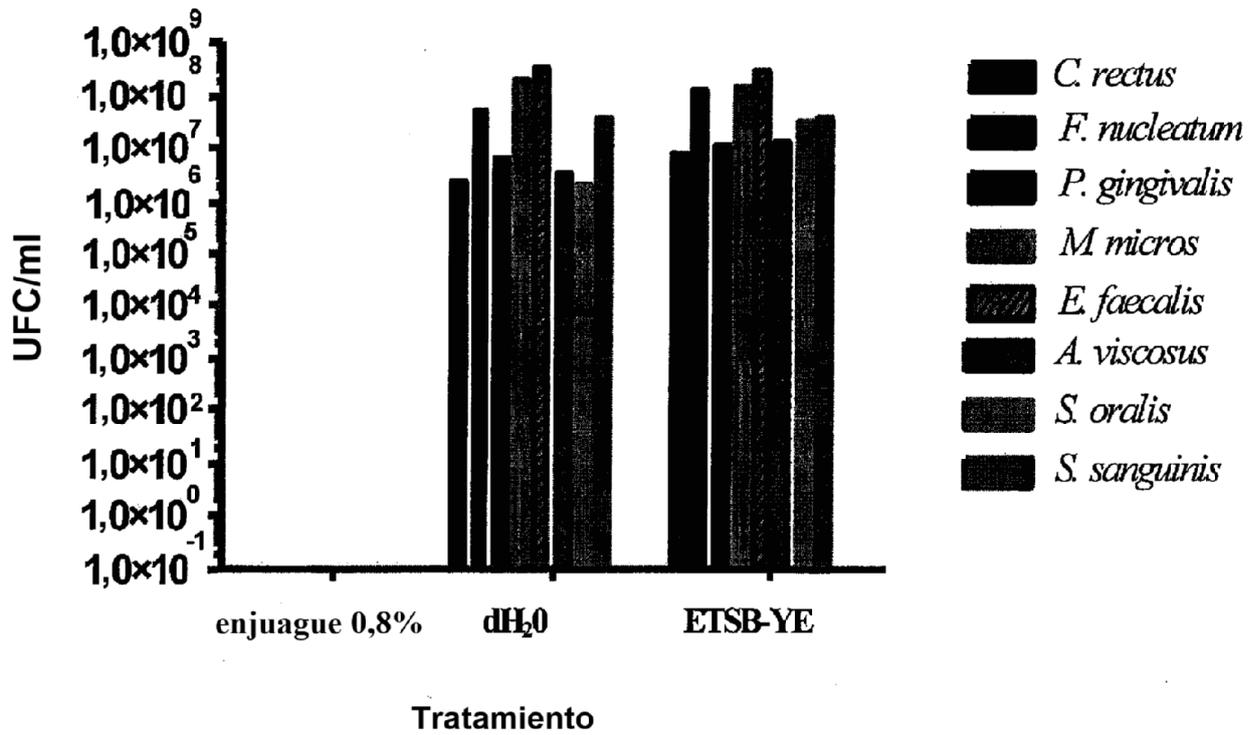


Figura 11

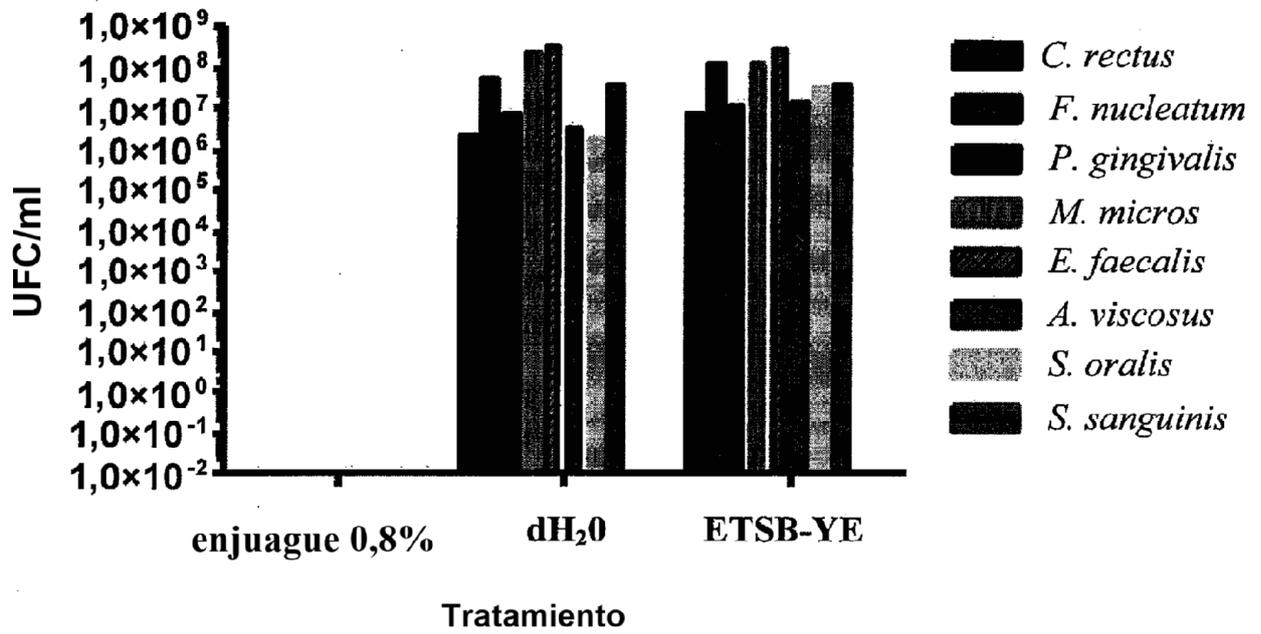


FIGURA 12

