

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 599**

51 Int. Cl.:

A61L 15/20	(2006.01)
A61L 15/44	(2006.01)
A61L 29/08	(2006.01)
A61L 29/16	(2006.01)
A01N 25/34	(2006.01)
A01N 25/12	(2006.01)
A01N 47/44	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2014 PCT/GB2014/051515**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184582**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2014 E 14725531 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2996468**

54 Título: **Micropartículas y nanopartículas antibacterianas que comprenden una sal de clorhexidina, método de producción y usos de las mismas**

30 Prioridad:

17.05.2013 GB 201308926

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2019

73 Titular/es:

**PERTINAX PHARMA LIMITED (100.0%)
Future Space, UWE North Gate, Filton Road,
Stoke Gifford
Bristol, BS34 8RB, GB**

72 Inventor/es:

REDMOND, MICHELE EMILY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 732 599 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

5 Micropartículas y nanopartículas antibacterianas que comprenden una sal de clorhexidina, método de producción y usos de las mismas

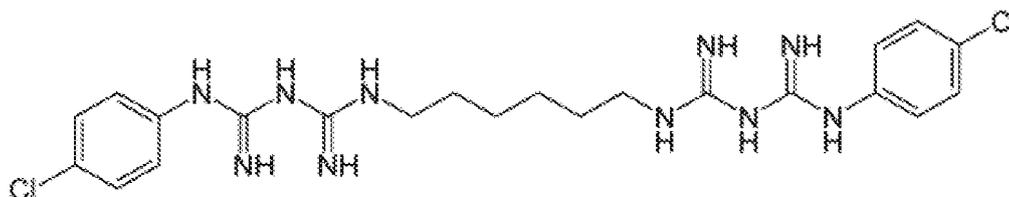
5 **Campo técnico**

10 La presente invención se refiere al campo de las micropartículas o nanopartículas antimicrobianas (MNP). De manera más específica, la presente invención se refiere a una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana que comprende una sal de clorhexidina y métodos para fabricar y usar la misma; artículos médicos y materiales compuestos que comprenden dichas MNP antimicrobianas para controlar la liberación de clorhexidina.

15 **Antecedentes**

15 La clorhexidina (CHX) es un antimicrobiano bien conocido que tiene utilidad en varias aplicaciones médicas. Estas incluyen preparaciones de limpieza de la piel, desinfectantes de manos y colutorios bucales. La CHX es un antimicrobiano útil debido a su eficacia contra las bacterias grampositivas y gramnegativas y muchas especies de levadura. Una ventaja adicional sobre otros antimicrobianos es las propiedades de resistencia a los antibióticos deseables asociadas con CHX. Aunque las poblaciones individuales de microbios pueden volverse menos sensibles a la CHX cuando se las somete a concentraciones ambientales crecientes, los estudios han demostrado que esta resistencia es temporal y cae cuando se elimina el estímulo CHX.

20 El nombre sistemático para CHX es N',N''''- hexano-1,6-diilbis [N- (4-clorofenil) (diamida imidodicarbonimídica)] y tiene la siguiente fórmula química.



30 El antimicrobiano CHX más común es una solución acuosa de la sal de digluconato de CHX fácilmente soluble. También se ha utilizado la sal diacetato de CHX (CHA), un poco menos soluble, a veces como un polvo cristalino seco que se añade a los materiales para conferir algunas propiedades antimicrobianas a esos materiales.

35 Un problema con estos compuestos de CHX es que cuando se usan en composiciones antimicrobianas, proporcionan solo una liberación a corto plazo de CHX acuoso a las áreas objetivo. Por ejemplo, en aplicaciones de higiene oral, el digluconato de CHX se puede administrar en la boca en un colutorio bucal, pero en cuestión de minutos, los niveles de CHX en esta solución acuosa se agotan considerablemente. Es necesario repetir el tratamiento para mantener la administración de niveles suficientes de antimicrobianos en el área objetivo.

40 Una limitación adicional es que la cantidad de CHX (por ejemplo, la cantidad por unidad de área de superficie) que se puede liberar de un sustrato tratado está limitada y relacionada con la concentración de la solución de CHX cuando se trata la superficie con sales de CHX solubles en solución y, por lo tanto, la eficacia antimicrobiana de estas soluciones también es limitada, no es fácilmente controlable, y puede no ser suficiente.

45 El documento EP 2462960 A2 desvela un dispositivo permanente médico, tal como un catéter que tiene un agente antimicrobiano. El dispositivo incluye un material base que es un copolímero de silicona-uretano y un agente bioactivo tal como CHX o una sal farmacológica adecuada del mismo, tal como CHA. La CHX se libera desde el material base a una velocidad dependiente de la composición copolimérica específica. La liberación lenta de CHX se observa en un periodo de 14 días. Sin embargo, las aplicaciones se limitan a recubrimientos en catéteres poliméricos porque se requiere que el polímero base retenga la CHX. Además, sería deseable proporcionar una liberación extendida de CHX en un grado aún mayor.

50 El documento US 2007/0212419 A1 desvela un hidrogel biocompatible (NCHG) nanocompuesto que contiene un gel de matriz, nanopartículas (NP) y CHX para su uso en el tratamiento de infecciones periodontales. Las NP son poliméricas, hechas de metacrilato de 2-hidroxietilo copolimerizado (HEMA) y dimetacrilato de polietilenglicol (PEGDMA). Los mismos monómeros se utilizan para producir la matriz reticulada. Cuando se utiliza digluconato de CHX como el agente activo. Las NP absorben CHX y se observa liberación extendida durante 200 horas. De nuevo, las aplicaciones están limitadas por la presencia del gel de matriz y el perfil de liberación de la CHX sigue siendo insatisfactorio para algunas aplicaciones. El NCHG no se puede usar para conferir propiedades antimicrobianas a artículos o composiciones médicas existentes.

60 El documento WO 2012/119155 describe composiciones antimicrobianas para administrar clorhexidina en

combinación con calcio, fosfato, fluoruro, plata, o iones de carbonato.

El documento WO2011009083 se refiere a la preparación de partículas que comprenden clorhexidina. Las partículas pueden usarse en el recubrimiento de productos, tales como dispositivos médicos. A continuación, los productos se utilizan para matar microorganismos y prevenir infecciones. Se preparan partículas que incluyen un agente antimicrobiano como, por ejemplo, CHX en sílice pirógena.

La presente invención aborda los problemas tratados anteriormente proporcionando una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana (MNP) que comprende una sal de CHX. Algunas de las sales de CHX particulares propuestas en el presente documento proporcionan MNP poco solubles que, en algunos aspectos, muestran un excelente perfil de liberación de CHX durante un período prolongado de meses en lugar de simplemente días o semanas. En algunas realizaciones, las MNP de CHX descritas en el presente documento pueden liberar CHX gradualmente durante más de 80 días. Otras sales de CHX propuestas en el presente documento tienen un período de liberación de CHX más corto pero, durante unas pocas horas o días, liberan una dosis muy alta de CHX soluble. En algunos aspectos, la liberación de CHX a partir de muestras tratadas con MNP de estas sales de CHX es más rápida y en mayor cantidad que la obtenida con muestras tratadas solo con una solución de CHX. Estos aspectos de liberación más rápida pueden ser útiles en aplicaciones de descontaminación o para tratar infecciones o brotes particularmente persistentes o agudos. Además, Las MNP pueden encontrar uso en una amplia variedad de aplicaciones, como recubrimientos o incrustados dentro de artículos médicos para conferir propiedades antimicrobianas adicionales, o como un componente de un material compuesto que se puede usar para liberar dosis constantes de CHX antimicrobiana a áreas objetivo durante un período largo de tiempo mediante la lixiviación gradual de CHX soluble fuera de las MNP antimicrobianas o para liberar dosis más altas de CHX mucho más rápidamente de lo que es posible en muestras tratadas con solución de CHX. Adicionalmente, las MNP de la presente invención también pueden exhibir perfiles de liberación retardada o perfiles en los que la liberación de CHX se desencadena por cambios en las condiciones ambientales.

Sumario

En determinados aspectos, la presente invención proporciona una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana que comprenden una sal de CHX. En particular, la presente invención proporciona micropartículas o nanopartículas antimicrobianas que comprenden una sal de CHX en la que el anión en la sal se selecciona entre oxoaniones y oxoaniones de fósforo parcialmente hidrogenados. Preferentemente, el anión se selecciona de oxoaniones de fósforo y, más preferentemente, el anión es al menos uno seleccionado de entre fosfatos. Más preferentemente, el anión se selecciona de entre los fosfatos seleccionados de la serie homóloga de polifosfatos que comienza con pirofosfato y la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato. Muy preferentemente, el anión se selecciona de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato, especialmente hexametafosfato.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana que comprende una sal de clorhexidina, en la que el anión en la sal se selecciona de entre: fosfatos seleccionados de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato; y la serie homóloga de polifosfatos que comienza con pirofosfato.

En aspectos preferidos, las MNP son de tamaño nano, es decir, las estructuras tienen al menos una dimensión en el intervalo de 1 nm - 1 μ m.

La presente invención también proporciona una suspensión coloidal de MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento.

Estas propuestas también proporcionan un artículo médico que comprende MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento y un material compuesto que comprende MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento.

La presente invención también contempla métodos para hacer y usar MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento.

Por "antimicrobiana" se entiende una sustancia que actúa para matar microorganismos o al menos inhibe su crecimiento. El término "microbio" se utiliza para describir un organismo microscópico, tal como bacterias, arqueas y / o hongos, por ejemplo. Por tanto, los compuestos antimicrobianos y las composiciones del presente documento pueden matar estos organismos microscópicos o al menos inhibir su crecimiento.

El término "fosfatos", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier anión basado en fósforo y oxígeno. Los fosfatos suelen estar formados por residuos ortofosforados coordinados tetraédricamente. Los fosfatos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos. Los fosfatos de ejemplo incluyen fosfatos de la serie homóloga de fosfatos lineales y polifosfatos que comienza con ortofosfato y pirofosfato, y la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato. Los organofosforados también se incluyen dentro de esta definición. Los

organofosfatos de ejemplo incluyen fosfatos de alquilo, tales como fosfatos de alquilo C₁₋₆.

Por "micropartícula o nanopartícula" se entiende partículas con un tamaño de entre aproximadamente 1 nm y 100 µm.

5 En la presente descripción, "micropartícula o nanopartícula" también pretende abarcar otras microestructuras y nanoestructuras adecuadas, tales como tubos (tanto de pared simple como de pared múltiple), rollos, varas, conos, formas de "erizo", cristales (tales como cristales alargados) y formas amorfas. Tales estructuras exhiben al menos una dimensión espacial de aproximadamente 1 nm a 100 µm, preferentemente de 1 nm a 10 µm, preferentemente de 1 nm a menos de 1 µm (es decir, "nanoestructuras" o dimensiones de "nanoescala"), más preferentemente de 5 nm a 500 nm, más preferentemente de 20 a 200 nm, incluso más preferentemente de 20 a 140 nm. Las tres dimensiones de la estructura pueden caer dentro de este intervalo de tamaño.

15 Breve descripción de las figuras

Nota: el tamaño de la barra de escala y el aumento de la imagen se indican entre corchetes para cada SEM.

20 La figura 1 muestra micrografías SEM de cubreobjetos de vidrio de borosilicato después de la inmersión en las siguientes composiciones. (a) una CHX acuosa (25 µM y 5 mM) [220 µm, 540x]; (b) 5/5 CHX-ortofosfato [10 µm, 6200x]; (c) 5/5 CHX-pirofosfato [20 µm, 5350x]; (d) 5/5 CHX-trifosfato [20 µm, 5150x].

25 La figura 2 muestra micrografías SEM de cubreobjetos de vidrio de borosilicato después de la inmersión en las siguientes composiciones. (e) 5/5 CHX-HMP [10 µm, 6500x]; (f) 5/5 CHX-nitrato [10 µm, 6400x]; (g) 5/5 CHX-carbonato [10 µm, 7800x].

30 La figura 3 muestra los perfiles de elución de CHX de especímenes de ortofosfato, pirofosfato y trifosfato.

La figura 4 muestra los perfiles de elución de CHX de especímenes de nitrato y carbonato, junto con especímenes de control que fueron expuestas a soluciones de CHX de 25 µM y 5 mM respectivamente.

35 La figura 5 muestra las siguientes micrografías SEM de apósitos para heridas de alginato. (a) espécimen de control, sin MNP [60 µm, 2000x]; (b) CHX-HMP-0,5 MNP [10 µm, 10400x]; (c) MNP CHX-HMP-5 [10 µm, 10000x].

La figura 6 muestra las siguientes micrografías SEM de cubreobjetos de vidrio de borosilicato. (a) espécimen de control, sin MNP [60 µm, 1980x]; (b) CHX-HMP-0,5 MNP [10 µm, 9900x]; (c) MNP CHX-HMP-5 [10 µm, 10000x].

40 La figura 7 muestra las siguientes micrografías SEM de un polímero de acetato de etilvinilo (EVA), algunos de los cuales incorporan MNP. (a) espécimen de control, sin MNP [10 µm, 9900x]; (b) CHX-HMP-0,5 MNP [10 µm, 9800x]; (c) MNP CHX-HMP-5 [10 µm, 10200x].

45 La figura 8 muestra las siguientes micrografías SEM en superficies de titanio, algunas de las cuales se han tratado con MNP. (a) espécimen de control, sin MNP [50 µm, 2080x]; (b) CHX-HMP-0,5 MNP [10 µm, 10000x]; (c) MNP CHX-HMP-5 [10 µm, 10000x].

50 La figura 9 muestra imágenes de AFM de las siguientes superficies de titanio, algunas de las cuales se han tratado con MNP (escala horizontal de 1 µm, escala vertical de 55 nm). (a) superficie de Ti pulida; (b) CHX-HMP-0,5 MNP; (c) MNP CHX-HMP-5.

La figura 10 muestra imágenes de AFM de las siguientes superficies de vidrio, algunas de las cuales se han tratado con MNP (escala horizontal de 1 µm, escala vertical de 60 nm). (a) vidrio no tratado limpio; (b) CHX-HMP-0,5 MNP; (c) MNP CHX-HMP-5.

55 La figura 11 muestra imágenes de AFM de las siguientes superficies de mica (ultraplanas), algunas de las cuales se han tratado con MNP (escala horizontal de 1 µm, escala vertical de 20 nm). (a) vidrio no tratado limpio; (b) CHX-HMP-0,5 MNP.

60 La figura 12 muestra los perfiles de elución de CHX de apósitos de alginato tratados con solución de control (CHX 25 µM), CHX-HMP-0,5 y CHX-HMP-5.

La figura 13 muestra los perfiles de elución de CHX a partir de vidrio tratado con solución de control (CHX 25 µM), CHX-HMP-0,5 y CHX-HMP-5.

65 La figura 14 muestra los perfiles de elución de CHX del polímero EVA tratado con solución de control (CHX 25 µM), CHX-HMP-0,5 y CHX-HMP-5.

La figura 15 muestra los perfiles de elución de CHX de titanio tratado con solución de control (CHX 25 μ M), CHX-HMP-0,5 y CHX-HMP-5.

5 La figura 16 muestra los perfiles de liberación de CHX acumulados a partir de especímenes de cemento de ionómero de vidrio (GIC) con niveles variables de tratamiento con MNP CHX-HMP.

La figura 17 muestra la liberación acumulada de fluoruro de especímenes de GIC con niveles variables de tratamiento con MNP CHX-HMP.

10 La figura 18 muestra las siguientes micrografías SEM que muestran las superficies de fractura de los especímenes de GIC. (a) GIC sin modificar [20 μ m, 5000x]; (b) 1 % en peso de MNP [20 μ m, 5050x]; (c) 2 % en peso de MNP [20 μ m, 5000x]; (d) 5 % en peso de MNP [20 μ m, 5000x]; (e) 10 % en peso de MNP [20 μ m, 5000x]; (f) 20 % en peso de MNP [20 μ m, 5050x].

15 La figura 19 muestra las mediciones de densidad óptica (DO) a 620 nm de CHX y CHX-HMP-5 contra SARM. A partir de estas se pueden calcular las concentraciones mínimas inhibitorias. Barras de color gris oscuro: CHX 25 μ M; barras de color gris claro: CHX-HMP-5.

20 La figura 20 muestra mediciones de densidad óptica (DO) a 620 nm de CHX y CHX-HMP-5 contra *P. aeruginosa*. A partir de estas se pueden calcular las concentraciones mínimas inhibitorias. Barras de color gris oscuro: CHX 25 μ M; barras de color gris claro: CHX-HMP-5.

25 La figura 21 muestra mediciones de densidad óptica (DO) a 595 nm después del tratamiento con CHX o CHX-HMP-5 contra SARM. A partir de estas se puede medir la inhibición de la biopelícula. Barras de color gris oscuro: CHX 25 μ M; barras de color gris claro: CHX-HMP-5.

30 La figura 22 muestra las mediciones de densidad óptica (DO) a 595 nm después del tratamiento con CHX o CHX-HMP-5 contra *P. aeruginosa*. A partir de estas se puede medir la inhibición de la biopelícula. Barras de color gris oscuro: CHX 25 μ M; barras de color gris claro: CHX-HMP-5.

La figura 23 muestra micrografías TEM de CHX-HMP-0,5 (superior) y (NP de CHX-HMP-5) (inferior). Los ejemplos de NP individuales se indican mediante flechas. Barras de escala = 500 nm.

35 La figura 24 muestra datos de DLS que muestran distribuciones de tamaño de (superior) CHX-HMP-5, y (inferior) de CHX-HMP-0,5. Los tres conjuntos de datos indican mediciones hechas por triplicado en cada concentración.

La figura 25 muestra datos de potencial zeta que muestran la distribución de la carga de CHX-HMP-5 (superior) y CHX-HMP-0,5 NP (inferior). Los tres conjuntos de datos indican mediciones hechas por triplicado para cada concentración.

40 La figura 26 muestra los perfiles de elución de CHX a partir de películas de CMC (55 g de CMC por m²) que contienen cantidades particulares de NP de CHX-HMP-5. Los cuadrados indican un Pm de CMC de 700 kDa y 6 % en peso de NP; los triángulos indican un Pm de CMC de 250 kDa y 6 % en peso de NP; las cruces indican un Pm de CMC de 700 kDa y 3 % en peso de MNP; los rombos indican un Pm de CMC de 250 kDa y 3 % en peso de NP; los círculos indican un Pm de CMC de 250 kDa y 0 % en peso de NP.

La figura 27 muestra los perfiles de elución de CHX a partir de películas de alginato que contienen cantidades particulares de MNP de CHX-HMP-5. Los cuadrados indican 6 % en peso de MNP; los rombos indican 3 % en peso de MNP.

50 La figura 28 muestra los perfiles de elución de CHX para (rombos) poliuretano recubierto con NP de CHX-HMP-5 en 1 capa de inmersión y (guiones) poliuretano tratado con una solución acuosa de CHX 25 μ M.

55 La figura 29 muestra imágenes SEM que muestran poliuretano recubierto con NP de CHX-HMP-5 usando (izquierda) 5 repeticiones [50 μ m, 2000x], y (derecha) 10 repeticiones [50 μ m, 2020x] del método de recubrimiento por inmersión. Las áreas claras muestran deposición de NP.

60 La figura 30 muestra imágenes de tinción de muertas vivas cuatro microbios cultivados en sustratos de poliuretano: (de arriba a abajo) SARM; *E. coli*; *P. aeruginosa*; y *K. pneumonia* tratada con (de izquierda a derecha) sin MNP (sin tratar); MNP de CHX-HMP-5; y MNP de CHX-HMP-50.

65 La figura 31 muestra la liberación de CHX a partir de siliconas recubiertas con NP de CHX-HMP-5 con tiempos de recubrimiento por inmersión de 1 min (rombos), 30 minutos (cuadrados), 2 horas (triángulos) o 6 horas (círculos) y una solución de CHX de control (guiones) para (parte superior) un cuerpo (B) de silicona y (parte inferior) un sellador (S) de silicona. El medio se refrescó a las 8 semanas para tener en cuenta cualquier saturación.

La figura 32 muestra la liberación de CHX a partir de siliconas recubiertas con NP de CHX-TP-5 con tiempos de recubrimiento por inmersión de 1 min (rombos), 30 minutos (cuadrados), 2 horas (triángulos) o 6 horas (círculos) y una solución de CHX de control (guiones) para (parte superior) un cuerpo (B) de silicona y (parte inferior) un sellador (S) de silicona. El medio se refrescó a las 8 semanas para tener en cuenta cualquier saturación.

La figura 33 muestra la liberación de CHX a partir de siliconas recubiertas con NP de CHX-TMP-5 con tiempos de recubrimiento por inmersión de 1 min (rombos), 30 minutos (cuadrados), 2 horas (triángulos) o 6 horas (círculos) y una solución de CHX de control (guiones) para (parte superior) un cuerpo (B) de silicona y (parte inferior) un sellador (S) de silicona. El medio se refrescó a las 8 semanas para tener en cuenta cualquier saturación.

La figura 34 muestra el crecimiento de *S. gordonii* en una superficie de titanio con un recubrimiento de NP de CHX-HMP-5 (a la izquierda, barra gris claro) y sin un recubrimiento de NP de CHX-HMP (a la derecha, barra gris oscuro).

La figura 35 muestra la liberación de CHX a partir de discos de hidroxiapatita tratados con soluciones de CHX acuoso o suspensiones de MNP de CHX-HMP de concentración equivalente en agua desionizada. Los datos de CHX acuosa se muestran como líneas discontinuas, mientras que los datos de suspensión de NP se muestran como líneas continuas. Las concentraciones de 5 mM se muestran en negro; las concentraciones de 2,2 mM se muestran en gris medio; y las concentraciones de 1 mM se muestran en gris claro. De abajo a arriba: CHX acuosa 1 mM; CHX acuosa 2,2 mM; Suspensión de NP 1 mM; CHX acuosa 5 mM; Suspensión de NP 2,2 mM; Suspensión de NP 5 mM.

La figura 36 muestra imágenes SEM de la superficie de la (izquierda) pintura de emulsión Diamond Matt [240 μ m, 490x] y (derecha) pintura de emulsión Diamond Matt [220 μ m, 530x] que contiene 25 % en masa de pasta de NP de CHX-HMP-5.

La figura 37 muestra el crecimiento de SARM (izquierda) y *E. coli* (derecha) en pintura Diamond Matt (control negativo, barras de la izquierda), Pintura Sterishield (control positivo, barras centrales) y "Nanopaint" (pintura que contiene MNP de CHX-HMP, barras a la derecha) después de 24 h de incubación. Las unidades del eje y están en unidades formadoras de colonias (UFC).

Descripción detallada

Nanopartículas antimicrobianas

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporcionan micropartículas o nanopartículas antimicrobianas que comprenden una sal de clorhexidina, en la que el anión en la sal se selecciona de entre: fosfatos seleccionados de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato; y la serie homóloga de polifosfatos que comienza con pirofosfato. Cuando al menos un anión seleccionado de esta lista se usa en un compuesto con CHX, se pueden formar MNP que son escasamente solubles. Esta solubilidad escasa significa que las MNP de la presente invención pueden demostrar un perfil de liberación adaptado. En algunos aspectos, el perfil es un perfil de liberación extendida, liberando un nivel constante de CHX en un entorno líquido circundante durante un período prolongado. En otros aspectos, la liberación de CHX es más rápida y / o en cantidades mayores como se ha indicado anteriormente, por ejemplo, en algunos casos, más rápido y en mayor cantidad de lo que se puede lograr a partir de una superficie tratada con una solución de solo CHX.

En la presente invención, "fosfatos" incluye cualquier anión basado en fósforo compuesto de residuos ortofosforados coordinados tetraédricamente unidos por la compartición de átomos de oxígeno y derivados de la desprotonación de un ácido fosfórico.

Los aniones fosfato particulares que pueden usarse en la presente invención no están particularmente limitados y pueden incluir cualquier anión que comprenda átomos de fósforo y oxígeno. Preferentemente, los aniones fosfato son monofosfatos o polifosfatos. Preferentemente, los aniones fosfato tienen una estructura lineal, ramificada o cíclica. Preferentemente, los aniones de fosfato se derivan por eliminación de uno o más átomos de hidrógeno, de un ácido polifosfórico que tiene la fórmula general $\text{HO}(\text{PO}_2\text{OH})_n\text{H}$, en la que n podría ser cualquier número entero, pero normalmente es de 1 a varios cientos, preferentemente 1 -10, más preferentemente 1-6.

Aún más preferentemente, el fosfato se selecciona de al menos uno de ortofosfato, pirofosfato, trifosfato o hexametafosfato. Los metafosfatos son particularmente preferidos, especialmente hexametafosfato.

En algunos aspectos, la MNP antimicrobiana de la presente invención comprende una sal de CHX poco soluble. Cuando las MNP comprenden una sal de este tipo que tiene baja solubilidad, la liberación de CHX de la MNP en el entorno líquido circundante se prolonga. Adicionalmente, cuando la sal es escasamente soluble de esta manera, las MNP tienden a formar una suspensión coloidal en agua, lo que es ventajoso para la deposición de las MNP sobre las

superficies mediante recubrimiento por inmersión, ya que proporciona una distribución más uniforme de las MNP en todo el líquido y porque la carga en las nanopartículas facilita su adsorción a las superficies de los materiales.

5 En algunos aspectos, las MNP antimicrobianas de la presente invención demuestran la liberación sostenida de CHX soluble en un entorno líquido durante un largo período de tiempo. Esto puede ser de al menos 90 días. En otros aspectos, las MNP antimicrobianas de la presente invención demuestran la liberación de CHX a niveles más altos que los que se pueden lograr mediante el tratamiento de superficies utilizando una solución de CHX simple. Esto puede durar solo un corto período de tiempo (tal como períodos de hasta 5 días, hasta 1 día, hasta 12 horas, hasta 6 horas, hasta 1 hora, hasta 30 minutos, hasta 10 minutos o hasta 1 minuto) o se puede liberar durante períodos más prolongados (tal como períodos de hasta 90 días, hasta 60 días, hasta 30 días o hasta 10 días).

10 Particular y preferentemente, la sal de clorhexidina es hexametáfosfato de clorhexidina (CHX-HMP). CHX-HMP es escasamente soluble y, por lo tanto, forma una suspensión coloidal de MNP. Estas MNP se pueden usar para recubrir un artículo o se pueden incorporar a un material compuesto. La relativa insolubilidad de CHX-HMP significa que la CHX se libera lenta y constantemente en el entorno circundante. CHX-HMP muestra un perfil de liberación extendida para la liberación de CHX.

15 Preferentemente, la MNP antimicrobiana de la presente invención muestra liberación prolongada y sostenida en un ambiente líquido (preferentemente un ambiente acuoso) de CHX soluble durante un período de al menos 7 días, preferentemente al menos 20 días, más preferentemente al menos 30 días, más preferentemente al menos 50 días, más preferentemente al menos 60 días, más preferentemente al menos 100 días y, en algunas situaciones, al menos seis meses o al menos doce meses. Esta liberación extendida y sostenida significa que CHX se libera continuamente de las MNP durante todo el período de tiempo. Preferiblemente, la velocidad de liberación es aproximadamente constante a lo largo de este período de tiempo, aunque se prevén realizaciones en las que la velocidad de liberación se altera, por ejemplo, disminuye, con el tiempo. Este perfil de liberación sostenida permite que las propiedades antimicrobianas de las MNP se exploten durante un largo período de tiempo sin la necesidad de una intervención adicional.

20 Preferentemente, la MNP antimicrobiana consiste esencialmente en una sal de CHX, en la que el anión en la sal se selecciona de entre al menos uno de los fosfatos. Por esto se entiende que una sal de CHX está presente en un MNP particular, pero que otros componentes también pueden estar presentes. Preferentemente, la sal de CHX constituye al menos un 40 % en peso, más preferentemente, al menos un 60 % en peso, más preferentemente al menos un 90 % en peso de la MNP antimicrobiana y particularmente preferentemente al menos un 99 % en peso. En algunas situaciones, la sal de CHX puede constituir hasta el 100 % en peso de la MNP antimicrobiana. Los otros componentes en las MNP pueden incluir uno o más de los polímeros (tales como polietilenglicol), cargas, colorantes y agentes (por ejemplo, silanos o polilisina) que pueden facilitar la unión a las superficies o la incorporación en materiales compuestos. Los niveles más altos de sal de CHX en las MNP proporcionan una eficacia antimicrobiana mejorada (por ejemplo, más fuerte y / o de mayor duración).

30 Las combinaciones de los aniones especificados también se pueden usar para producir MNP antimicrobianas, por ejemplo, por coprecipitación del catión de CHX con una mezcla de diferentes aniones. Por ejemplo, los aniones que conducen a MNP que exhiben una liberación rápida de niveles altos de CHX pueden combinarse con aniones que conducen a MNP que exhiben liberación de CHX en niveles más bajos pero durante un período más prolongado. Tales partículas pueden ser útiles, por ejemplo, en dispositivos médicos, especialmente aquellos que son implantados quirúrgicamente, donde los altos niveles iniciales de liberación de CHX podrían contrarrestar las bacterias presentes debido a la cirugía en sí misma y durante más tiempo, la liberación de nivel menor de CHX mantendría un sitio limpio durante un período extendido. Preferentemente, la MNP antimicrobiana comprende una sal de CHX y un anión seleccionado de los enumerados anteriormente. Por ejemplo, las presentes propuestas incluyen una mezcla de MNP que comprende sal hexametáfosfato de CHX con MNP que comprenden una sal de CHX en la que el anión se selecciona de ortofosfato, pirofosfato y trifosfato.

40 En algunos aspectos, además del catión de CHX puede haber uno o más cationes adicionales en la MNP antimicrobiana, por ejemplo uno o más cationes metálicos, por ejemplo, Cu o Ag.

55 En algunos casos, las MNP antimicrobianas de la presente invención son partículas de liberación retardada, es decir, la liberación de CHX se retrasa durante un período de tiempo después de aplicar las MNP a la superficie de un sustrato o incorporándolas en un compuesto. Durante este período de retardo, preferentemente no se libera CHX de las MNP o, en algunos casos, la liberación de CHX a partir de las MNP durante este período de retardo es baja, por ejemplo, menos de 10 %, preferentemente menos de 5 %, más preferentemente, menos del 1 % de la velocidad de liberación final inmediatamente después del período de retardo. En casos preferidos, las MNP son sensibles a los cambios en las condiciones ambientales. En tales casos, se puede decir que las MNP muestran propiedades "inteligentes". Preferentemente, la liberación de CHX a partir de las MNP se desencadena por un cambio en las condiciones ambientales. Por ejemplo un cambio en el pH, la concentración de un determinado componente de disparo, o temperatura del ambiente circundante. Aún más preferentemente, la MNP exhibirá una liberación retardada de CHX, con la liberación de CHX provocada por un cambio en el medio ambiente, tal como una disminución del pH (es decir, un aumento de la acidez). Dicha disminución del pH se puede producir tras la formación de una biopelícula

bacteriana de modo que la liberación de CHX de las MNP en respuesta a la presencia de una biopelícula bacteriana. Esto se puede lograr mediante, por ejemplo, la inclusión de un componente en las MNP, o un recubrimiento en las MNP que responda a los cambios en las condiciones ambientales, como los mencionados anteriormente. Como alternativa, las características de liberación retardada pueden adaptarse mediante la selección de una sal de CHX
 5 apropiada, por ejemplo, mediante la selección de los aniones apropiados, que exhiben un cambio tal como protonación o desprotonación sobre el cambio deseado en condiciones ambientales, por ejemplo, reducción del pH. Preferentemente, las MNP muestran una liberación retardada inherente de CHX desencadenada por la reducción del pH causada por la presencia o formación de una biopelícula bacteriana.

10 En algunos casos, las MNP antimicrobianas de la presente invención tienen propiedades antimicrobianas intrínsecas. En otras palabras, las MNP demuestran propiedades antimicrobianas además de y aumentando el efecto asociado con la liberación de CHX soluble en el medio ambiente. La eficacia antimicrobiana observada se debe no solo a la CHX liberada en la solución, sino a la presencia de las propias MNP. Por ejemplo, en algunas situaciones, las MNP con hexametáfosfato de CHX parecen mostrar propiedades antimicrobianas inherentes. De
 15 esta manera, las MNP antimicrobianas de la presente invención pueden ofrecer propiedades antimicrobianas por encima de las de una solución acuosa de CHX antimicrobiana o una composición que simplemente libera CHX antimicrobiana en el medio ambiente sin que el medio de liberación muestre ninguna eficacia antimicrobiana.

Las MNP antimicrobianas de la presente invención pueden tener diversas formas estructurales. Se pueden
 20 seleccionar de entre partículas, tubos (tanto de pared simple como de pared múltiple), rollos, varas, conos, forma de erizo, cristales y formas amorfas. Preferentemente, las MNP son partículas o cristales.

Las MNP antimicrobianas de la presente invención tienen un tamaño de 1 nm a 100 μm , preferentemente de 1 nm a 10 μm , preferentemente de 1 nm a 1 μm (es decir, a nanoescala), más preferentemente de 5 nm a 500 nm, más
 25 preferentemente de 20 a 200 nm, incluso más preferentemente de 20 a 140 nm.

Suspensión coloidal de nanopartículas antimicrobianas

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una suspensión coloidal que comprende una
 30 micropartícula o nanopartícula antimicrobiana como se describe en el presente documento.

Preferentemente, la suspensión coloidal de la presente invención es una suspensión coloidal en agua. El agua es un disolvente simple y seguro para trabajar con él y su biocompatibilidad hace que la suspensión sea segura para su
 35 uso en aplicaciones sensibles.

Aún más preferentemente, la suspensión coloidal de la presente invención es una suspensión coloidal en una solución acuosa. Esta puede ser una solución acuosa de CHX. La solución también puede comprender otros iones disueltos o componentes adicionales (por ejemplo, tensioactivo, estabilizante, conservante etc.).

40 Preferentemente, la suspensión coloidal de la presente invención tiene un valor absoluto de potencial zeta (ζ) de magnitud mayor que o igual a 15 mV, más preferentemente mayor o igual a 20 mV, incluso más preferentemente mayor que o igual a 40 mV y particularmente preferentemente mayor que o igual a 50 mV. El potencial zeta es una medida de la estabilidad de las dispersiones coloidales y su tendencia a formar agregados. Un valor absoluto de potencial zeta elevado indica una suspensión estable que es menos probable que coagule o flocule. Esta es una
 45 propiedad deseable que hace que los recubrimientos con mayor uniformidad sean más fáciles de preparar al recubrir por inmersión de un sustrato.

Cuando el valor absoluto o el módulo del potencial zeta de la dispersión coloidal es al menos 30 mV, la dispersión demuestra una estabilidad aceptable con respecto a la coagulación. Cuando el valor absoluto del potencial zeta es de al menos 40 mV, la estabilidad de la suspensión es excelente, y no se espera que la suspensión coagule y solo muestre un comportamiento de sedimentación durante un largo período de tiempo. Adicionalmente, cuando el valor absoluto del potencial zeta es de al menos 20 mV, las MNP exhiben propiedades de recubrimiento deseables y pueden adherirse a la superficie de un artículo para proporcionar un recubrimiento superficial de MNP antimicrobianas.
 50

Artículo médico

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un artículo médico que comprende MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento.
 60

El artículo médico de la presente invención no está particularmente limitado y puede ser cualquier artículo destinado al contacto con el cuerpo, ya sea de forma externa o interna, o para su uso en un entorno médico como en hospitales o consultas médicas. Dichos artículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. En las presentes propuestas, los ejemplos de artículos incluyen varios tipos de catéter; artículos orales, tales como implantes dentales, dentaduras y protectores bucales, apósitos para heridas o embalajes médicos.
 65

Preferentemente, el artículo médico de la presente invención es un catéter venoso, catéter urinario, implante dental, protector bucal, dentaduras postizas, apósitos para heridas o embalajes médicos. Dichos artículos pueden estar provistos ventajosamente de propiedades antimicrobianas adicionales mediante la funcionalización con las MNP antimicrobianas descritas en el presente documento, por ejemplo, por tratamiento de superficie para establecer un recubrimiento de superficie que comprende las MNP en el artículo, o por incorporación de las MNP en el material del propio artículo.

Preferentemente, el artículo médico de la presente invención es un catéter. En algunos aspectos, el catéter se funcionaliza con las MNP antimicrobianas mediante un recubrimiento de superficie. En otros aspectos, las MNP antimicrobianas se incorporan dentro de al menos una parte del catéter durante la producción de los materiales utilizados para fabricar el catéter. La colonización de las superficies del catéter y los tejidos circundantes por bacterias, tal como *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) es un importante problema de salud. En los catéteres de la presente invención que están funcionalizados con MNP antimicrobianas, la colonización por bacterias se previene o reduce debido a la actividad antimicrobiana de las MNP.

Preferentemente, el artículo médico de la presente invención es un implante dental. Los implantes dentales son dispositivos utilizados para reemplazar o aumentar el hueso natural en la mandíbula o maxilar (huesos de la mandíbula). Una sección de pilar del implante sobresale de la encía y al mismo se acoplan dientes protésicos o dientes. Un problema asociado con tales implantes es su fallo a medio y largo plazo debido a la colonización de la superficie del implante por bacterias y la formación de una biopelícula bacteriana patogénica. En los implantes dentales de la presente invención, el implante dental comprende MNP antimicrobianas (ya sea como un recubrimiento de superficie o incorporado al propio implante dental) y esto evita o reduce la probabilidad de formación de una biopelícula y hace que la incorporación exitosa del implante sin el riesgo de infección sea más probable.

Preferentemente, el implante dental comprende las MNP antimicrobianas en forma de un recubrimiento de superficie. Aún más preferentemente, la superficie del implante dental está recubierta escasamente con MNP antimicrobianas. Por ejemplo, se prefiere una cobertura de área de 25 % o menos, preferentemente del 15 % o menos, más preferentemente del 10 % o menos, incluso más preferentemente del 5 % o menos. El titanio se usa a menudo para hacer implantes dentales debido a la propiedad útil del titanio para osteointegrarse con el hueso (formando una unión entre el material y el hueso que es tan fuerte como el hueso en sí). Un recubrimiento disperso de MNP en la superficie de titanio es ventajoso porque la osteointegración todavía puede dar lugar a una extensión significativa, sin dejar de proporcionar las propiedades antimicrobianas asociadas con las MNP. Si se utiliza un recubrimiento demasiado denso, la osteointegración es menos completa y la unión entre el implante y el hueso es más débil. Si se utiliza un recubrimiento demasiado escaso, las propiedades antimicrobianas de las MNP son menos evidentes.

El artículo médico también puede ser un apósito para heridas. Un apósito para heridas que comprende las MNP antimicrobianas de la presente invención ofrece una eficacia antimicrobiana más duradera que los apósitos ordinarios para heridas y otros apósitos antimicrobianos conocidos. Esto es importante en los apósitos para heridas, incluidas las heridas agudas y quirúrgicas, y las heridas crónicas o que no cicatrizan. Las MNP antimicrobianas de la presente invención, particularmente las MNP de hexametáfosfato de CHX, son efectivas contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el agente infeccioso más común en lesiones por quemaduras y también contra SARM y *Streptococcus gordonii*. Los apósitos funcionalizados para heridas de la presente invención ayudan a reducir el riesgo de infección cuando se usan para curar heridas, que incluyen quemaduras y otras heridas similares.

El artículo médico de la presente invención puede ser un producto de prótesis que incluye una dentadura postiza o un obturador del paladar. Un producto de prótesis dental o prótesis dental es un dispositivo que se utiliza en la cavidad bucal para reemplazar los dientes perdidos o las secciones del paladar y restaurar la función dental. La parte inferior de las dentaduras postizas que se apoya en el paladar es propensa a la infección, particularmente por la levadura *Candida albicans*. En algunos aspectos, las MNP de la presente invención, particularmente las MNP de hexametáfosfato de CHX, son efectivas contra una amplia variedad de levaduras, incluyendo *C. albicans*. Cuando se utiliza un producto de prótesis que comprende las MNP antimicrobianas de la presente invención, existe un riesgo muy reducido de infección.

El artículo médico de la presente invención puede ser un protector bucal. Los protectores bucales se utilizan en varias aplicaciones, incluyendo el uso en deportes para proteger los dientes y como prevención de bruxismo o rechinar los dientes. Estos protectores bucales están hechos normalmente de un polímero como el acetato de etilenvinilo (EVA) y son propensos a la formación de biopelículas bacterianas en las superficies. Los protectores bucales de la presente invención comprenden las MNP antimicrobianas descritas en el presente documento (ya sea como un recubrimiento de superficie o incorporados en el polímero EVA) que son efectivos para prevenir o retardar la formación de tales biopelículas, protegiendo al portador frente a la infección.

El artículo médico de la presente invención puede ser un embalaje médico, una bandeja de quirófano o una cortina médica. El embalaje médico es cualquier tipo de embalaje utilizado para encerrar o proteger equipos médicos. Las bandejas del quirófano a menudo están hechas de acero inoxidable y se utilizan para transportar equipos quirúrgicos

esterilizados. Las cortinas médicas pueden ser cualquier cortina, cortina u otros textiles utilizados en un entorno médico. De acuerdo con la presente invención, cualquiera de estos puede comprender, ventajosamente, MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento para reducir o prevenir la colonización por bacterias.

- 5 Las MNP antimicrobianas pueden incorporarse en el artículo médico de varias maneras, que no están particularmente limitadas.

10 En algunas situaciones, el artículo médico incluye un recubrimiento de superficie de MNP antimicrobianas. Un recubrimiento de superficie se puede aplicar fácilmente mediante recubrimiento por inmersión o recubrimiento por pulverización. Los recubrimientos superficiales son efectivos en la protección de las superficies externas de los artículos que a menudo son colonizados por bacterias.

15 En algunas situaciones, las MNP están incorporadas integralmente dentro del artículo. Preferentemente, el artículo médico comprende MNP antimicrobianas incrustadas en al menos una parte de la superficie externa del artículo. Las MNP pueden incorporarse al material utilizado para hacer el artículo durante la fabricación, por ejemplo, durante el procesamiento de un polímero para un catéter o la extrusión del tubo del catéter.

20 En algunos aspectos, uno o más materiales que pueden componer un artículo médico pueden proporcionarse con MNP; por ejemplo, pueden estar recubiertos por inmersión con MNP. En algunos aspectos, el material comprende: un polímero de relevancia médica y de consumo, tal como siliconas médicas, EVA y poliuretano, un material de implante, tal como titanio, vidrio o un apósito para heridas comercial.

Materiales compuestos

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un material compuesto que comprende las MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento. Un material compuesto que comprende estas MNP antimicrobianas puede liberar CHX durante un período extendido como se ha descrito anteriormente en relación con las propias MNP. Esto confiere propiedades antimicrobianas sobre estos materiales.

30 El material compuesto de la presente invención no está particularmente limitado y puede incluir cualquier material que incorpore MNP antimicrobianas para conferir propiedades antimicrobianas a ese material. Los materiales de ejemplo incluyen, pero sin limitaciones, pinturas, pastas, polímeros, hidrogeles y cementos dentales.

35 Preferentemente, el material compuesto de la presente invención es un cemento de ionómero de vidrio, una pintura o una composición para el cuidado bucal. Estos materiales pueden proporcionarse ventajosamente con propiedades antimicrobianas adicionales mediante la inclusión de MNP antimicrobianas dentro de ellos. Los siguientes compuestos que contienen MNP han sido creados con éxito: cementos de ionómero de vidrio, películas de alginato, películas de carboximetilcelulosa, pintura, y colutorio bucal / tratamiento tópico.

40 Preferentemente, las MNP antimicrobianas están presentes en el material compuesto hasta un 60 % en peso, 50% en peso, 40 % en peso o 30 % en peso. A niveles superiores al 60 % en peso, el compuesto puede perder parte de su funcionalidad prevista o propiedades estructurales debido al gran contenido de MNP. Preferentemente, las MNP antimicrobianas están presentes en el material compuesto en mayor o igual al 1 % en peso, 5 % en peso o 10 % en peso. A niveles por debajo de aproximadamente 1 % en peso, las propiedades antimicrobianas debidas a la presencia de MNP se reducen significativamente, pero aún pueden ser adecuadas para algunos propósitos.

50 Preferentemente, el material compuesto de la presente invención es un cemento de ionómero de vidrio (GIC). Los GIC se usan en odontología para muchos fines, incluyendo como material de relleno coloreado para dientes, como agente de sujeción y revestimiento, en el Tratamiento Restaurativo Atraumático (TRA), en restauraciones cercanas al margen gingival y como sellador de fisuras. Se sabe que los GIC son capaces de participar en el intercambio iónico con el entorno oral. Cuando el material compuesto que comprende las MNP antimicrobianas descritas en la presente invención es un GIC, la CHX se filtra fuera del GIC y la liberación extendida de CHX de las MNP puede ayudar a prevenir las caries secundarias en el área que rodea al tratamiento con GIC. La liberación de CHX se mantiene por mucho más tiempo que otros GIC que incorporan sales solubles de CHX, tal como diacetato de CHX o digluconato de CHX. En algunos aspectos, los GIC de la presente invención pueden lixiviar CHX en el medio ambiente durante más de 30 días, preferentemente más de 60 días, más preferentemente más de 90 días.

60 Los GIC tradicionales carecen de eficacia antimicrobiana, y la caries secundaria (la recurrencia de la caries dental alrededor o debajo del relleno) es un problema común. Cuando los GIC comprenden las MNP antimicrobianas de la presente invención, las propiedades antimicrobianas conferidas al GIC pueden ayudar a prevenir caries secundarias.

65 Preferentemente, el GIC de la presente invención es capaz de absorber CHX del medio ambiente. De esta manera, el GIC puede "recargarse" con CHX para volver a formar las MNP de sal de CHX originales en el GIC cuando se agota el suministro existente. Se sabe que los GIC actúan de esta manera con respecto a la captación de fluoruro de la cavidad oral. De esta manera, la eficacia antimicrobiana del GIC puede continuar indefinidamente a lo largo de la vida útil del GIC, reponer el suministro de MNP de sal de CHX cuando sea necesario. El uso de las MNP

antimicrobianas de la presente invención significa que los intervalos entre estas reposiciones pueden ser relativamente largos, por ejemplo, al menos 60 o 100 días o incluso más, debido a la liberación extendida de CHX.

5 Preferentemente, las MNP antimicrobianas están presentes en el GIC del 1 % en peso al 30 % en peso, más preferentemente del 1 % en peso al 20 % en peso, de la forma más preferentemente del 1 % en peso al 10 % en peso. A niveles de MNP superiores al 30 % en peso, las propiedades de manipulación y la resistencia a la tracción del GIC pueden verse afectadas negativamente y en niveles por debajo de aproximadamente 1 % en peso, la acción antibacteriana debida a la presencia de las MNP se reduce.

10 El material compuesto de la presente invención puede ser una pintura. Las pinturas antimicrobianas pueden usarse en quirófanos, clínicas dentales y médicas, guarderías, residencias y otros entornos similares. Proporcionar una pintura con las propiedades antimicrobianas de larga duración demostradas por las MNP antimicrobianas de la presente invención sería altamente ventajoso. Las MNP antimicrobianas de la presente invención son eficaces contra varios microorganismos que incluyen *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM). Una pintura que
15 comprende las MNP antimicrobianas de la presente invención ofrece resistencia contra SARM entre otros microbios infecciosos, lo cual es altamente ventajoso especialmente cuando se usa en los entornos mencionados anteriormente.

20 El material compuesto de la presente invención puede ser una composición para el cuidado oral que comprende las MNP antibacterianas como se describe en el presente documento. Una composición para el cuidado bucal es un material destinado a usar en la cavidad bucal por razones de higiene general o para el tratamiento de la caries dental o una infección periodontal particular. Preferentemente, la composición para el cuidado oral es una pasta de dientes, una pasta protectora o un colutorio bucal.

25 Método de preparación una nanopartícula antimicrobiana

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para preparar una MNP antimicrobiana como se describe en el presente documento que comprende hacer reaccionar una solución acuosa de cationes de CHX con un anión seleccionado de fosfatos seleccionados de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que
30 comienza con trimetafosfato, y la serie homóloga de polifosfatos que comienza con pirofosfato; en una proporción de 1:100 a 100:1 para producir una suspensión coloidal de micropartículas o nanopartículas.

Preferentemente, los dos reactantes están presentes en concentraciones equimolares, es decir, 50:50. A concentraciones de reactante equimolares, la suspensión coloidal resultante tiene un tamaño coloide satisfactorio y un potencial zeta. Preferentemente, la concentración del catión de CHX en la mezcla de reacción es de
35 aproximadamente 5 mM. Preferentemente, la concentración del anión como se ha descrito anteriormente en la mezcla de reacción es de aproximadamente 5 mM.

Preferentemente, el método comprende hacer reaccionar una solución acuosa de cationes de CHX con un anión fosfato seleccionado de fosfatos seleccionados de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato, y la serie homóloga de polifosfatos que comienza con pirofosfato; más preferentemente seleccionado de ortofosfato, pirofosfato, trifosfato y hexametafosfato. Aún más preferentemente, el método comprende hacer reaccionar una solución acuosa de cationes de CHX con aniones de hexametafosfato. El uso de HMP produce una
40 suspensión coloidal con buen potencial zeta y propiedades de tamaño, y buena solubilidad.

Preferentemente, el reactivo HMP es HMP recién preparado, por ejemplo, preparado 60 minutos o menos antes de su uso, para evitar el riesgo de hidrólisis no deseada del reactivo antes de su uso. En algunos aspectos, uno o más aniones adicionales pueden estar presentes en la mezcla de reacción. En algunos aspectos, uno o más cationes
45 adicionales (además de CHX) también pueden estar presentes en la mezcla de reacción.

También pueden estar presentes en la mezcla de reacción componentes adicionales. Estos pueden ser componentes destinados a incorporar en las MNP, o componentes que ayudan a prevenir la aglomeración de las MNP, por ejemplo, recubriendo las MNP después de la formación. Preferentemente, el polietilenglicol (PEG) está presente en la mezcla de reacción como agente preventivo de la aglomeración. En algunos casos, el PEG se
50 recubre sobre la superficie de las MNP después de la formación.

Preferentemente, La mezcla de reacción se agita rápidamente durante los procesos de mezcla y formación de MNP.

En determinados aspectos, las MNP se recuperan de la suspensión coloidal en una etapa adicional. Esto se puede lograr mediante centrifugación a aproximadamente $205.940 \text{ m} / \text{s}^2$ (21.000 g) durante 60 minutos, seguido de la eliminación del sobrenadante y el secado a 40-60 °C durante unos días. Las partículas resultantes se pueden eliminar y moler hasta obtener un polvo fino para obtener agregados de MNP.

65 Como alternativa, la solución de KCl a una concentración de aproximadamente 1 M puede añadirse a la suspensión y dejarse durante aproximadamente 15 minutos. Esto crea una compresión de la capa de carga, causando que las MNP se sedimenten. La eliminación del sobrenadante seguido de una centrifugación a aproximadamente $49.033 \text{ m} /$

s² (5.000 g) durante 10 minutos proporciona una pasta después de la eliminación del sobrenadante. Esto se puede secar opcionalmente para producir las MNP.

Método de uso de nanopartículas antimicrobianas

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para formar un recubrimiento superficial de las MNP antimicrobianas como se describe en el presente documento, que comprende sumergir el artículo en una suspensión coloidal de las MNP, retirar el artículo de la suspensión y, opcionalmente, enjuagarlo con agua desionizada y secar.

10 Preferentemente, durante la inmersión del artículo en la suspensión, la suspensión se agita rápidamente, por ejemplo, a aproximadamente 150 rpm.

15 Preferentemente, el artículo se sumerge en la suspensión coloidal durante un período de 1s a 30 minutos. La cobertura MNP lograda está relacionada con el tiempo de inmersión, por lo tanto, si se requiere una cobertura más densa, el tiempo de inmersión se debe ampliar en consecuencia.

20 Opcionalmente, el artículo se enjuaga con agua desionizada tras la inmersión. El enjuague elimina el exceso de MNP de la superficie del artículo. Preferentemente, el artículo se enjuaga durante un período de 1 s a 30 s. La cobertura de MNP lograda está relacionada con el tiempo de enjuague, por lo tanto, si se requiere una cobertura más densa, el tiempo de enjuague debe reducirse en consecuencia o la etapa de enjuague puede eliminarse.

25 Las MNP de CHX-HMP y / o los materiales funcionalizados con las MNP de CHX-HMP tienen eficacia contra varios microbios, incluyendo SARM, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *A. baumannii*, *S. gordonii*, *P. gingivalis* y *C. albicans*. Se han utilizado varios métodos y ensayos para evaluar la eficacia antimicrobiana, tales como recuentos viables totales (unidades formadoras de colonias), ensayos de tiempo-muerte, zonas de inhibición, pruebas de viabilidad vivas / muertas e imágenes usando una serie de técnicas de microscopía.

30 Con respecto a los intervalos numéricos desvelados en la presente descripción, se entenderá, por supuesto, que en la forma normal el criterio técnico para el límite superior es diferente del criterio técnico para el límite inferior, es decir, los límites superior e inferior son propuestas intrínsecamente distintas.

35 Para evitar dudas, se confirma que en la descripción general anterior, de la forma habitual, las preferencias y opciones generales descritas con respecto a las diferentes características de las MNP, se describen artículos, composiciones y métodos de forma independiente y pueden combinarse en otras combinaciones de características en la medida en que sean compatibles.

Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención.

Ejemplos 1-6; Ejemplos comparativos 1-3: Elución de CHX a partir de superficies de vidrio de borosilicato funcionalizadas

45 Las sales basadas en clorhexidina se prepararon combinando, a temperatura ambiente y bajo agitación rápida, 100 ml de clorhexidina (como la sal de digluconato en solución acuosa a una concentración de 10 mM) y 100 ml de uno de un intervalo de aniones en solución acuosa, también a una concentración inicial de 10 mM, para efectuar concentraciones totales finales de 5 mM de cada uno. Los aniones utilizados se muestran en la Tabla 1.

50

Tabla 1

Nombre abreviado	Reactivo	Proveedor
Ortofosfato	Hidrógeno ortofosfato de disodio	Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido
Pirofosfato	Pirofosfato de tetrasodio pentabásico	Fisher Scientific
Trifosfato	Trifosfato de sodio pentabásico	Sigma Aldrich, Gillingham, Reino Unido
Hexametáfosfato	Hexametáfosfato de sodio	Sigma Aldrich
Carbonato	Carbonato de calcio	Fisher Scientific
Nitrato	Nitrato de calcio tetrahidratado	Sigma Aldrich

El precipitado se dejó adherir luego sobre cubreobjetos de vidrio de borosilicato. Cubreobjetos (Agar Scientific, Stansted, Reino Unido) se limpiaron con ultrasonidos en acetona durante 10 minutos seguidos de ultrasonidos 10

minutos en alcoholes industriales metilados y se dejaron secar al aire. Se sumergieron en la suspensión de 200 ml descrita anteriormente mientras se agitaba rápidamente usando una placa de agitación magnética. Los cubreobjetos se sumergieron durante 30 segundos, se retiraron, se sumergieron en agua desionizada durante 10 segundos para enjuagar, se secaron para eliminar el exceso de líquido y se dejaron secar al aire.

5 La superficie de vidrio resultante con depósitos a base de CHX se investigó utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). Un banco de pruebas SEM (Phenom, Eindhoven, Países Bajos) y un AFM (Nanoscope IIIa, Digital Instruments, UU.) que funcionaban en modo de extracción con ángulos de nitruro de silicio para examinar la superficie. Los especímenes se recubrieron con una capa de oro-paladio utilizando un recubridor de pulverización catódica antes de la SEM.

15 La elución de CHX soluble de las superficies de vidrio funcionalizadas se examinó usando espectrofotometría ultravioleta. Se colocaron 8 especímenes de cada tipo en cubetas etiquetadas individualmente adecuadas para espectrofotometría ultravioleta. Se añadieron 2,5 ml de agua desionizada a las cubetas y se sellaron herméticamente utilizando tapas de cubetas. Estos se agitaron en un agitador orbital que giraba a 150 rpm. Las cubetas se mantuvieron selladas y se tomaron muestras de la concentración de clorhexidina a intervalos durante un período de 14 días. Los conjuntos de control se prepararon donde las muestras se habían sumergido solo en agua desionizada y donde se habían sumergido solo en una solución de CHX 25 μ M o 5 mM; 25 μ M es la concentración de CHX soluble residual en la suspensión de CHX-HMP y 5 mM es la concentración total de CHX (soluble y unida) en las preparaciones.

Las imágenes SEM de las muestras se muestran en las Figuras 1-2. Los perfiles de elución de CHX de las muestras se muestran en las Figuras 3-4. Todos los especímenes liberaron CHX soluble.

25 La Tabla 2 muestra las propiedades de liberación de CHX de las diversas sales de CHX probadas.

Tabla 2

	Medio de recubrimiento	Periodo de liberación de CHX
Ejemplo 1	5/5 CXH-ortofosfato	Solo liberación inmediata, sin liberación sostenida
Ejemplo 2	5/5 CHX-pirofosfato	Solo liberación inmediata, sin liberación sostenida
Ejemplo 3	5/5 CHX-trifosfato	Solo liberación inmediata, sin liberación sostenida
Ejemplo 4	5/5 CHX-hexametafosfato	> 14 días
Ejemplo de referencia 5	5/5 CHX-carbonato	48-72 h
Ejemplo de referencia 6	5/5 CHX-nitrato	48-72 h
Ejemplo comparativo 1	Agua desionizada	N/A
Ejemplo comparativo 2	CHX 25 μ M	48-72 h
Ejemplo comparativo 3	CHX 5 mM	48-72 h

Ejemplo 1 - CHX-ortofosfato

30 Los especímenes funcionalizados de CHX-ortofosfato (CHX-OP) mostraron algunas áreas con un depósito de matriz porosa autoensamblado, pero también las estructuras inusuales que se ven en la Figura 1b y la Figura 3a. Estos estaban compuestos por disposiciones de cristalitos alargados que se originan desde un punto central y se extienden radialmente desde este punto (formas de "erizo"). Estas estructuras tenían normalmente un diámetro de 30-50 μ m y los cristalitos individuales tenían un ancho de aproximadamente 0,50-1 μ m. Los cristalitos a menudo estaban ligeramente curvados.

Ejemplo 2 - CHX-pirofosfato; Ejemplo 3 - CHX-trifosfato; Ejemplo 4 - CHX-hexametafosfato

40 Los especímenes funcionalizados con CHX-pirofosfato (CHX-PP), CHX-trifosfato (CHX-TP) y CHX-HMP exhibieron depósitos similares de una matriz porosa autoensamblada. Esto parecía una cobertura densa y más amplia en el CHX-PP y el CHX-TP que en el CHX-HMP.

45 El ortofosfato, Las sales de pirofosfato y trifosfato de CHX mostraron la mayor liberación de CHX. Estos fueron capaces de efectuar una liberación muy grande de CHX en poco tiempo, que fue mucho mayor y más rápida que la liberación observada con los especímenes expuestos simplemente a una solución de CHX. La liberación más alta se observó desde pirofosfato, un nivel intermedio a partir de trifosfato y el más bajo a partir de ortofosfato, aunque

incluso esto fue aproximadamente 4 veces la magnitud de la liberación de CHX observada en otros especímenes analizados. La liberación en todos los casos se produjo en el momento inicial sin evidencia de liberación sostenida. Estas partículas podrían usarse en materiales para los cuales se requiere una gran dosis de antimicrobianos por vía tópica. Un ejemplo podría ser un tratamiento de descontaminación para un dispositivo médico, tal como un obturador del paladar o una dentadura postiza.

Las sales de hexametáfosfato de CHX exhibieron la liberación total más baja de cualquiera de los aniones, pero esta se sostuvo durante el experimento (14 días) y todavía seguía al finalizar las mediciones. En otro experimento más largo, las sales de hexametáfosfato de CHX mostraron liberación durante al menos un periodo de 90 días. Estas partículas pueden encontrar aplicación en aquellos materiales que requieren una eficacia antimicrobiana durante periodos más largos, tales como catéteres permanentes, cánulas e implantes.

Ejemplos de referencia: 5 - CHX-carbonato; y 6 - CHX-nitrato

Los especímenes expuestos a la preparación de CHX-carbonato exhibieron estructuras de nanotubos formadas espontáneamente dispuestas en formaciones aproximadamente esféricas (Figura 2 g). Eran predominantemente tubos de pared simple, pero en algunas áreas se podían ver nanotubos de doble pared o nanotubos dentro de nanotubos.

Los depósitos observados en los especímenes funcionalizados con CHX-nitrato se distribuyeron escasamente y la mayoría de las áreas aparecieron sin rasgos distintivos en la SEM.

Las sales de nitrato y carbonato de CHX exhibieron una menor liberación de CHX que el ortofosfato, pirofosfato y trifosfato y la liberación continuó durante unos pocos días. Los especímenes de nitrato y carbonato liberaron CHX y esta liberación se mantuvo durante aproximadamente 48 a 72 h; después de este tiempo, la concentración de CHX se estabilizó y se puede considerar que la liberación se ha completado. Estos pueden encontrar aplicación en un producto que requiere eficacia antimicrobiana durante este período, tal como un apósito para heridas o suturas.

Ejemplos comparativos 1-3

Las superficies de vidrio tratadas con agua o soluciones acuosas de CHX aparecen sin rasgos distintivos y planas (Figura 1a). Los especímenes tratados con CHX liberaron CHX y esta liberación se mantuvo durante aproximadamente 48 a 72 h; después de este tiempo, la concentración de CHX se estabilizó y se puede considerar que la liberación se ha completado (Figura 4).

Ejemplos 7-14; Ejemplos comparativos 4-7: Elución de CHX a partir de materiales funcionalizados con CHX-HMP

Síntesis y caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas de CHX-HMP (NP) se prepararon combinando, a temperatura ambiente y bajo agitación rápida, CHX (como la sal de digluconato en solución acuosa) y HMP (como la sal de sodio en solución acuosa) para efectuar concentraciones totales finales de 5 y 5 o 0,5 y 0,5 mM de cada uno. De aquí en adelante se denominarán CHX-HMP-5 y CHX-HMP-0,5.

La mezcla de los dos reactivos dio como resultado la formación de una suspensión coloidal. El tamaño de partícula y el potencial zeta de las nanopartículas en las suspensiones coloidales se caracterizaron mediante la dispersión dinámica de la luz (DLS) en función del tiempo y la movilidad electroforética (Malvern Zetasizer, Malvern, Reino Unido).

Preparación y caracterización de materiales funcionalizados con nanopartículas

Los especímenes de una gama de materiales se recubrieron con las nanopartículas. Los materiales utilizados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Ejemplo	Nombre abreviado	Descripción	Preparación	Proveedor
7,8	Vidrio	Cubreobjetos de vidrio de borosilicato circular de 12 mm de diámetro	10 min de ultrasonidos en acetona, 10 min de ultrasonidos en alcoholes metilados industriales, secar al aire	Agar Scientific, Stansted, Reino Unido

(continuación)

Ejemplo	Nombre abreviado	Descripción	Preparación	Proveedor
9,10	Apósitos para heridas de alginato	Secciones de 10 x 7 mm de un apósito para heridas disponible comercialmente que contiene fibras de alginato	Utilizado tal como se suministra	"Savlon Alginate Dressings", Novartis Consumer Health, Horsham, Reino Unido
11,12	Polímero EVA	Secciones de acetato de etilvinilo de 7 x 7 x 3 mm	10 min de ultrasonidos en alcoholes metilados industriales, secar al aire	Data Plastics, Witney, Reino Unido
13,14	Titanio	Secciones cuadradas de 10 x 10 x 1 mm de titanio comercialmente puro de grado 2,	Pulido con papel de carburo de silicio de grano 80, 10 min de ultrasonidos en acetona, 10 min de ultrasonidos en alcoholes metilados industriales, secar al aire	Titek, Sutton Coldfield, Reino Unido

Se prepararon 200 ml de la suspensión coloidal utilizando reactivos recién preparados (para evitar la hidrólisis del HMP). El espécimen se sumergió en el coloide agitado rápidamente durante 30 s, luego se retiró y se sumergió en agua desionizada durante 10 s para enjuagar, y luego se secó para eliminar el exceso de líquido y se dejó secar al aire.

Las superficies funcionalizadas con nanopartículas se examinaron utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM; Nanoscope IIIa, Digital Instruments, CA, EE.UU.) para aquellos con superficies adecuadas (vidrio, titanio) pero no para aquellos con superficies muy rugosas o desiguales (apósito de alginato, polímero de EVA). Todos los especímenes se examinaron utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM) (Phenom, Eindhoven, Países Bajos) después de recubrir con una aleación de oro-paladio utilizando una unidad de recubrimiento por pulverización catódica (SC7620, Emitech, Taiwán). Dado que ni el vidrio ni el titanio eran superficies atómicamente planas, era difícil distinguir entre las características de las superficies pequeñas (<20 nm) y las nanopartículas pequeñas; por esta razón, las nanopartículas de CHX-HMP-5 y CHX-HMP-0,5 también se depositaron sobre mica recién cortada para resolver la más pequeña de ellas.

Se colocaron 8 especímenes de cada material recubierto con nanopartículas de CHX-HMP-5 y CHX-HMP-0,5 en cubetas etiquetadas individualmente adecuadas para espectrofotometría ultravioleta. Se añadió agua desionizada a las cubetas y se sellaron herméticamente utilizando tapas de cubetas. Estos se agitaron en un agitador orbital que giraba a 150 rpm. Las cubetas se mantuvieron selladas y se tomaron muestras de la concentración de clorhexidina a intervalos durante un período de 60-90 días. Los conjuntos de control se prepararon donde los especímenes se sumergieron en agua desionizada y donde se sumergieron en una solución de CHX 25 µM, que es la concentración de CHX acuosa residual en la suspensión coloidal de CHX-HMP-5.

Recuperación opcional de NP de suspensión coloidal

Opcionalmente, las NP pueden recuperarse de la suspensión después de que se haya llevado a cabo la reacción. Esto no se hizo en el caso de los presentes Ejemplos, sin embargo, se puede lograr mediante una de las siguientes opciones:

1) Colocar en tubos de centrifuga de alta g o Eppendorf y centrifugar a $205.940 \text{ m} / \text{s}^2$ (21.000 g) durante 60 min. Esto da una separación moderada; todavía hay evidencia de que las NP permanecen en el sobrenadante visto como un líquido ligeramente turbio. Retirar el sobrenadante y desechar, usar después la pasta de NP o secar en un horno a 40-60 grados durante unos días, raspar y moler hasta obtener un polvo blanco fino, dando agregados de NP. Estos se pueden añadir, por ejemplo, a cementos dentales u otros materiales.

2) Como alternativa a 250 ml de suspensión coloidal 5/5 añadir 25 ml de KCl 1 M, dejar durante 15 minutos y la mayor parte de las NP sedimentarán en el fondo del recipiente debido a la compresión de la capa de carga. Decantar y desechar el sobrenadante y recoger el líquido densamente poblado en el fondo en recipientes de centrifugación. Centrifugar a $49.033 \text{ m} / \text{s}^2$ (5000 g) durante 10 min. Esto proporciona una separación mucho más efectiva debido a la compresión de la capa de carga alrededor de las NP y se puede usar para procesar grandes cantidades de NP con el equipo de laboratorio más típico. La pasta se puede raspar después de descartar el sobrenadante y se puede usar, por ejemplo, para añadir a pinturas u otros materiales. Como alternativa, la pasta se puede secar y usar como se ha descrito anteriormente.

El tamaño de partícula dominante y el potencial zeta de las suspensiones de CHX-HMP-0,5 y CHX-HMP-5 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 1

Preparación de nanopartículas	Tamaño de partícula [nm] (desviación estándar)	Potencial zeta [mV] (desviación estándar)
CHX-HMP-0,5	122 (47)	-39,6 (3,2)
CHX-HMP-5	141 (44)	-47,5 (6,5)

El DLS indicó una distribución de tamaño bimodal con algunos especímenes en los que se observó un segundo pico de un diámetro mucho más pequeño a aproximadamente 20-60 nm. Las imágenes SEM de las superficies funcionalizadas con nanopartículas se muestran en las Figuras 5-8 y AFM de las superficies de vidrio, titanio y mica funcionalizadas se muestran en las figuras 9-11. Los especímenes de titanio y vidrio presentan una rugosidad a nanoescala que hace que sea imposible distinguir la superficie del sustrato de las nanopartículas con un diámetro inferior a aproximadamente 40 nm, pero la superficie de mica de control es atómicamente plana y estas imágenes dan claras indicaciones de una capa confluyente de nanopartículas con diámetros de normalmente 20-100 nm.

La elución con clorhexidina de las superficies funcionalizadas con nanopartículas se muestra en las Figuras 12-15.

Los especímenes de materiales diferentes investigados se funcionalizaron con éxito con nanopartículas antimicrobianas de CHX-HMP y mostraron una lixiviación gradual de CHX soluble durante un período de hasta 90 días. Las imágenes SEM y AFM en las Figuras 5-11 proporcionan una visualización clara de nanopartículas individuales y agregados de nanopartículas porosas autoensambladas espontáneamente en la mayoría de las superficies.

La Tabla 5 muestra los períodos de liberación de CHX para los diferentes materiales funcionalizados. Para cantidades de liberación de CHX, véanse las Figuras 12-15.

Tabla 5

	Material	Medio de recubrimiento	Periodo de liberación de CHX
Ejemplo 7	Vidrio	CHX-HMP-5	> 90 días
Ejemplo 8	Vidrio	CHX-HMP-0,5	20-25 días
Ejemplo 9	Apósito de alginato	CHX-HMP-5	> 50 días
Ejemplo 10	Apósito de alginato	CHX-HMP-0,5	> 50 días
Ejemplo 11	Polímero EVA	CHX-HMP-5	> 80 días
Ejemplo 12	Polímero EVA	CHX-HMP-0,5	~ 20 días
Ejemplo 13	Titanio	CHX-HMP-5	> 60 días
Ejemplo 14	Titanio	CHX-HMP-0,5	5 días
Ejemplo comparativo 4	Vidrio	Solución CHX 25 μ M	Sin liberación
Ejemplo comparativo 5	Apósito de alginato	Solución CHX 25 μ M	> 60 días
Ejemplo comparativo 6	Polímero EVA	Solución CHX 25 μ M	Sin liberación
Ejemplo comparativo 7	Titanio	Solución CHX 25 μ M	Poca o ninguna liberación significativa

Ejemplo 7 - Vidrio funcionalizado con CHX-HMP-5

Ejemplo 8 - Vidrio funcionalizado con CHX-HMP-0,5

Ejemplo comparativo 4 - Vidrio expuesto a solución de CHX 25 μ M de control

Las superficies de vidrio funcionalizadas con nanopartículas liberaron CHX durante el período experimental (Figura 13) y la CHX liberada se relacionaron con la densidad inicial de las nanopartículas y los agregados de nanopartículas, exhibiendo las superficies CHX-HMP-5 más densamente recubiertas una liberación mayor y más prolongada, que las superficies con recubrimiento de CHX-HMP-0,5 menos denso (Figura 6). Para las muestras de

CHX-HMP-0,5, la liberación de CHX soluble cesó después de aproximadamente 20-25 días, mientras que para los especímenes de CHX-HMP-5, la liberación aún continuaba en el punto de 90 días. El grupo de control tratado con CHX 25 μM no mostró ninguna liberación de CHX, lo que indica que la CHX soluble se eliminó completamente mediante la etapa de enjuague y, por lo tanto, la liberación de CHX observada con los especímenes funcionalizados con nanopartículas se debió a la presencia de estas nanopartículas. Este desarrollo puede encontrar aplicación en productos de consumo y biomédicos que contienen vidrio y similares al vidrio que se beneficiarían de una funcionalidad antimicrobiana prolongada, tales como cementos de ionómero de vidrio, un material de relleno dental que comprende partículas de vidrio incrustadas en una matriz de cemento.

Ejemplo 9 - Apósito para heridas de alginato funcionalizado con CHX-HMP-5

Ejemplo 10 - Apósito para heridas de alginato funcionalizado con CHX-HMP-0,5

Ejemplo comparativo 5 - Apósito para heridas de alginato expuesto a una solución de control de CHX 25 μM

La liberación de CHX más alta, cuando se normalizan con respecto al área de superficie, fue a partir del apósito para heridas de alginato (Figura 12). Las imágenes SEM muestran claramente un recubrimiento denso de agregados de nanopartículas en casi todas las fibras con las nanopartículas de CHX-HMP-5 y una distribución más dispersa en los especímenes recubiertos con nanopartículas de CHX-HMP-0,5 (Figura 5). Hubo cierta liberación de CHX del espécimen tratado con la solución de control de CHX 25 μM , lo que indica que el material absorbió algo de CHX soluble de la solución, pero la cantidad de CHX liberada de los especímenes de control fue mucho menor que la observada en las muestras funcionalizadas con nanopartículas (Figura 12). Hubo una relación dosis-respuesta en la que los especímenes de CHX-HMP-5 mostraron una liberación mayor que los especímenes de CHX-HMP-0,5 y esto se correlacionó con una cobertura más amplia de nanopartículas con la preparación de CHX-HMP-5 (Figura 5). Tanto para los especímenes de CHX-HMP-5 como de CHX-HMP-0,5, la liberación aún estaba en curso al concluir el experimento, lo que indica que las nanopartículas no se habían agotado en este momento. Estos hallazgos pueden ser útiles para desarrollar apósitos para heridas que protejan las heridas crónicas o que no se curan de una infección.

Ejemplo 11 - Polímero EVA funcionalizado con CHX-HMP-5

Ejemplo 12 - Polímero EVA funcionalizado con CHX-HMP-0,5

Ejemplo comparativo 6 - Polímero de EVA expuesto para controlar una solución de CHX 25 μM

Las superficies de polímero de EVA recubiertas con nanopartículas de CHX-HMP-5 mostraron los mismos agregados de nanopartículas característicos que se observaron en el vidrio y el apósito para heridas de alginato, aunque la cobertura fue normalmente algo menos densa que la de los otros sustratos (Figura 7). Los especímenes de EVA CHX-HMP-0,5 mostraron una liberación muy baja y de corta duración de CHX soluble. Los especímenes de CHX-HMP-5, sin embargo, mostraron una liberación prolongada de CHX hasta por lo menos 80 días (Figura 14) y esto fue comparable pero ligeramente superior a la liberación observada en los especímenes de vidrio cuando se normalizó al área de la superficie. Estos hallazgos pueden encontrar aplicación en los desarrollos de dispositivos médicos basados en polímeros antimicrobianos, tales como catéteres venosos y urinarios, y en aplicaciones tópicas periódicas de recubrimientos antimicrobianos para productos poliméricos extraíbles, tales como los protectores bucales para deportes y bruxismo.

Ejemplo 13 - Titanio funcionalizado con CHX-HMP-5

Ejemplo 14 - Titanio funcionalizado con CHX-HMP-0,5

Ejemplo comparativo 7 - Titanio expuesto solución de control de CHX 25 μM

Las superficies de titanio mostraron una clara evidencia de agregaciones de nanopartículas de CHX-HMP, como se ve en la Figura 8. Los especímenes funcionalizadas con CHX-HMP-5 mostraron una liberación continua y sostenida de CHX soluble durante la duración de los experimentos; numéricamente esta versión fue aproximadamente el doble que la vista desde las superficies de vidrio y polímero. Las superficies funcionalizadas de CHX-HMP-0,5 liberaron poca cantidad de CHX y esta liberación cesó después de aproximadamente 5 días. Las nanopartículas de CHX-HMP-5 podrían encontrar aplicación en el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos para implantes dentales y ortopédicos fabricados de titanio o aleación de titanio, y ofrecen la ventaja sobre los recubrimientos antimicrobianos tradicionales, ya que las nanopartículas generan un recubrimiento discontinuo con abundante titanio aún expuesto y disponible para la colonización por células osteoblastos.

Ejemplos 15-18; Ejemplos comparativos 8-10: Estudios de microbiología*Microbiología: cepas bacterianas*

- 5 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM); NCTC13142) se cultivó en medio Mueller-Hinton (MH). *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626 (ATCC 9027) se cultivó en caldo nutritivo (NB) o agar nutritivo (NA). Todos los cultivos se incubaron aeróbicamente a 37 °C durante todo el estudio.

Microbiología: concentración mínima inhibidora

- 10 La concentración inhibitoria mínima (CIM) para el control acuoso de clorhexidina 25 µM y el coloide CHX-HMP-5 contra bacterias planctónicas se determinó mediante dilución al doble en serie (0 - 25 µM) en un volumen total de 100 µl de medio apropiado en una placa de microtitulación de 96 pocillos (de acuerdo con la metodología de la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana para determinar la CIM). Los cultivos se incubaron durante 16 horas a 37 °C en condiciones aeróbicas, las lecturas de densidad óptica (DO) se midieron a 620 nm (A620) utilizando un lector de placa de microtitulación estándar (SpectroStar Nano; BMG Labtech).

Microbiología: recuentos de viables totales

- 20 Se tomaron muestras de los pocillos de la placa de microtitulación y se diluyeron en serie (10^{-1} - 10^{-6}) en solución salina tamponada con fosfato (PBS); Se enumeraron alícuotas de 10 µl utilizando el método de recuento de células viables totales (TVC) de Miles y Misra (véase Hyg (Lond), vol. 38, pp. 732-749, 1938) con MH o NA como medio no selectivo. Los números de células recuperadas se calcularon como UFC ml⁻¹.

Microbiología: modelo de biopelícula estática

- Las cepas bacterianas se cultivaron inicialmente durante 16 horas y estos cultivos de fase estacionaria se recogieron mediante centrifugación y se ajustaron a una $DO_{650} = 0,1$. Las biopelículas se cultivaron en 50 µl de medio apropiado a 37 °C durante 48 h, aeróbicamente luego se retiró el medio y se desechó. Las bacterias poco adherentes se eliminaron lavando las biopelículas dos veces con 100 µl de PBS. Se añadieron nanopartículas de clorhexidina o clorhexidina diluidas en PBS a las biopelículas utilizando una dilución doble como se ha descrito anteriormente (0 - 25 µM). Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C; para estimar la biomasa, las células no unidas se aspiraron suavemente y se descartaron, y las células adherentes se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con violeta cristal (0,25 % p / v) durante 10 minutos; después de otros dos lavados con PBS, la violeta de cristal unida a las células se solubilizó con ácido acético al 7 % y la absorbancia se midió a 595 nm (A_{595}).

Microbiología: biopelículas sobre muestras de polímero EVA nanofuncionalizadas

- Los precultivos de SARM y *P. aeruginosa* se cultivaron inicialmente durante 16 h en medios apropiados a 37 °C, aeróbicamente. Los ensayos de crecimiento en piezas de polímero se determinaron colocando cada cubo en el pocillo de una MTP de 24 pocillos y añadiendo 1 ml de medio líquido apropiado (suficiente para cubrir el espécimen de polímero). Los especímenes de polímero fueron polímeros EVA, como se especifica en la Tabla 3, que se limpiaron mediante ultrasonidos de 10 minutos en IMS seguidos de ningún tratamiento (control), 30 s de inmersión en CHX-HMP-5 agitado seguido de 10 s en agua desionizada (NP baja) y 30 s de inmersión en CHX-HMP-5 agitado sin enjuague (NP alta). A cada pocillo se inocularon 10 µl de pre-cultivos de SARM o *P. aeruginosa* y luego se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los especímenes de polímeros se retiraron de los pocillos con pinzas estériles y se transfirieron a tubos de microcentrifuga que contenían 1 ml de PBS. Los tubos se agitaron en vórtex durante 1 minuto para eliminar las bacterias adherentes y la suspensión celular se diluyó en serie (10^{-1} - 10^{-6}) y las bacterias se enumeraron utilizando el método de Miles Misra.

- 50 La Tabla 6 muestra la CMI para los medios de control y CHX-HMP-5.

Tabla 6

	Media	CMI, conc. de CHX total (conc. de CHX soluble)
Ejemplo 15	Suspensión de CHX-HMP-5	SARM: 0,625 mM (3,12 µM); P.a.: 0,312 mM (1,56 µM) (mínima probada)
Ejemplo comparativo 8	CHX 25 µM	SARM: No establecido (no eficaz) P.a.: (25 µM)

- 55 La Tabla 7 muestra los efectos de diferentes medios sobre las biopelículas bacterianas estáticas de SARM y *P. aeruginosa*.

Tabla 7

	Media	Efecto sobre la biopelícula
Ejemplo 16	CHX-HMP-5	SARM: interrupción grave P.a.: interrupción grave
Ejemplo comparativo 9	CHX 25 μ M	SARM: interrupción leve P.a.: interrupción leve

La Tabla 8 muestra los efectos antimicrobianos de los especímenes de polímero de EVA nanofuncionalizados.

5

Tabla 8

	Muestra	Resultado
Ejemplo 17	Alta NP de CHX-HMP-5 en EVA	SARM: Sin bacterias P.a.: Sin bacterias
Ejemplo 18	Baja NP de CHX-HMP-5 en EVA	SARM: Sin bacterias P.a.: Altos niveles de bacterias, medio líquido de baja turbidez
Ejemplo comparativo 10	EVA sin tratar	SARM: 5×10^5 UFC ml^{-1} recuperado P.a.: Altos niveles de bacterias recuperadas, medio líquido de alta turbidez

Se descubrió que la CMI para SARM para la suspensión coloidal de CHX-HMP-5 era una dilución 8x del coloide, que corresponde a una concentración de CHX *total* (soluble y unida) de 0,625 mM y una concentración de CHX *soluble* de 3,12 μ M. La CMI para SARM no pudo establecerse para clorhexidina 25 μ M, lo que indica que esta solución no fue eficaz contra SARM (Figura 19). Para *P. aeruginosa*, se descubrió que la CMI para CHX-HMP-5 era una dilución 16x del coloide, que fue la concentración mínima probada; esta corresponde a una concentración de CHX total de 0,312 mM y una concentración de CHX soluble de 1,56 μ M. La CMI para la concentración de clorhexidina 25 μ M fue la solución no diluida, es decir, 25 μ M, lo que indica que *P. aeruginosa* era más susceptible a las nanopartículas que el SARM (Figura 20). Las TVC confirmaron los datos de la CMI, con $1,5 \times 10^{12}$ ufc ml^{-1} recuperado para el control no tratado con SARM y ninguna bacteria recuperada de muestras cultivadas con diluciones 8x y 4x del coloide DE CHX-HMP-5, lo que sugiere que la CMI también era bactericida. De forma análoga, para *P. aeruginosa* no se pudieron recuperar bacterias de muestras cultivadas a una dilución 16x y 8x del coloide de CHX-HMP-5, en comparación con $1,34 \times 10^9$ UFC ml^{-1} recuperado para el control no tratado.

10

15

20

25

30

Las biopelículas de SARM se rompieron con el coloide DE CHX-HMP-5 y, en menor medida, con la clorhexidina acuosa 25 μ M (Figura 21). El coloide DE CHX-HMP-5 también interrumpió las biopelículas de *P. aeruginosa* (Figura 22) más eficazmente que la clorhexidina acuosa 25 μ M a diluciones de entre 16x y 4x; a niveles 2x y no diluidos, la clorhexidina 25 μ M y las nanopartículas fueron igualmente eficaces. Respecto al crecimiento de biopelículas sobre polímero EVA nanofuncionalizado, para el polímero de control, las células bacterianas de *P. aeruginosa* recuperadas de los especímenes eran demasiado numerosas para contarlas en todas las diluciones utilizadas; se recuperó SARM a 5×10^5 UFC ml^{-1} . Para las piezas de polímero recubiertas con una baja concentración de nanopartículas, las células bacterianas fueron demasiado numerosas para contar en todas las diluciones de *P. aeruginosa*, pero ninguna de las células fue recuperable para SARM. Cabe señalar que para *P. aeruginosa*, el medio líquido circundante era menos turbio que el control (lo que indica un menor crecimiento) a pesar de la gran cantidad de bacterias que se estaban recuperando y que para el SARM el medio circundante era transparente, lo que indica que no hay crecimiento. Para las piezas de polímero recubiertas con una alta concentración de nanopartículas, no se pudieron recuperar bacterias para SARM ni para *P. aeruginosa* y el medio circundante fue claro en ambos casos.

35

Los experimentos de microbiología indicaron que el coloide de CHX-HMP-5 fue eficaz contra SARM y *P. aeruginosa* cultivadas planctónicamente *in vitro* y que este efecto no se debió a la CHX soluble 25 μ M residual presente en la solución que baña el coloide. Además, los estudios de biopelículas indicaron que el coloide de CHX-HMP-5 era eficaz contra las biopelículas de SARM y *P. aeruginosa in vitro*. Además, los especímenes de polímero EVA recubiertos con nanopartículas de CHX-HMP-5 mostraron eficacia contra las biopelículas de SARM y *P. aeruginosa*.

40

Ejemplos 19-24; Ejemplo comparativo 11: Cementos de ionómero de vidrio sustituidos con NP de CHX-HMP

Síntesis y preparación de nanopartículas de CHX-HMP

45

Las soluciones madre acuosas de digluconato de clorhexidina y hexametáfosfato de sodio (ambas Sigma Aldrich) se mezclaron en agua desionizada, de modo que la concentración final fue CHX 4 mM y 5 mM. La suspensión coloidal resultante se mezcló completamente y luego se centrifugó a $205.940 \text{ m} / \text{s}^2$ (21.000 g) durante 60 min. El

sobrenadante se eliminó y se desechó, y el sedimento de NP se secó durante al menos 48 horas a 40 °C. A continuación, el sedimento se retiró de los tubos de centrifuga y se trituró hasta obtener un polvo blanco fino utilizando un mortero. Este polvo se añadió al GIC por sustitución del polvo de vidrio.

5 *Cementos ionómeros de vidrio nanofuncionalizados*

Un GIC disponible comercialmente (Diamond Carve (TM), Kemdent, Purton, Reino Unido) se utilizó como material de partida. Las muestras de GIC cilíndricas con dimensiones nominales de 6 mm de diámetro y 3 mm de altura se formaron mezclando los GIC de acuerdo con las instrucciones del fabricante y envasándolos en moldes de Perspex recubiertos con una capa delgada de vaselina para facilitar la eliminación. La mezcla fue llevada a cabo por individuos con amplia experiencia en la preparación de GIC. Las dimensiones precisas de cada espécimen se midieron utilizando calibradores y se registraron. El polvo de NP se mezcló con partes alícuotas del polvo de vidrio de GIC en sustituciones de 0, 1, 2, 5, 10, 20 y 30 % en peso. Se crearon diez especímenes de cada sustitución, dando un total de 70 especímenes. Se retiraron del molde en 60 minutos y se colocaron en pequeños recipientes de plástico sellados individuales que contenían papel de tejido húmedo que no está en contacto directo con el espécimen, para lograr una atmósfera de 100 % de humedad, pero evita que el espécimen entre en contacto con el agua líquida, lo que podría resultar en la disolución durante las fases iniciales críticas del establecimiento. Se almacenaron a 37 °C durante 7 días.

Después de este tiempo, los especímenes se dividieron en dos grupos de 5 especímenes cada uno. Una serie de cada sustitución se reservó para pruebas de resistencia a la tracción y morfología y la otra se usó para investigar la clorhexidina y la lixiviación de fluoruro del cemento.

Para las investigaciones de liberación de clorhexidina y fluoruro, cada espécimen se sumergió en 1 ml de saliva artificial en viales marcados individualmente a 37 °C. La saliva artificial estaba compuesta por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,103 gl^{-1} , MgCl_2 0,019 gl^{-1} , KH_2PO_4 0,544 gl^{-1} , $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (forma ácida de tampón HEPES) 4,77 gl^{-1} , KC1 2,24 gl^{-1} , 1,80 ml HCl 1M, KOH titulado para obtener un pH de 6,8. Las muestras se extrajeron periódicamente y se colocaron en tubos duplicados que contenían saliva artificial fresca, de modo que la saliva artificial en la que se había incubado el espécimen podría tomarse muestras para las concentraciones de clorhexidina y de fluoruro. Se realizó un estudio piloto para establecer el límite de saturación de la concentración de fluoruro dentro de los recipientes para garantizar que los períodos de muestreo se seleccionaran de manera apropiada y no se obtuvieron lecturas erróneas debido a la saturación del eluyente por una sal de fluoruro, dejando un espacio demasiado grande entre las lecturas. Usando los hallazgos de este estudio piloto, el muestreo se produjo a intervalos de una hora durante el primer día, seguido de intervalos de 4 horas, a continuación diariamente y luego semanalmente. Los controles que contenían solo saliva artificial sin un espécimen de GIC se muestrearon de la misma manera.

Mediciones de clorhexidina

La concentración de clorhexidina en la saliva artificial se midió utilizando espectrofotometría ultravioleta (UV). La saliva artificial de 1 ml se colocó en una semimicrocubeta transparente bajo longitudes de onda UV y la absorción se midió a 255 nm utilizando un espectrofotómetro. La lectura se convirtió en concentración de clorhexidina con referencia a los patrones de calibración a 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de clorhexidina que se midieron al principio y al final de cada ciclo de medición. La concentración se convirtió en moles de clorhexidina liberada por unidad de área de superficie de la muestra de GIC con referencia a las medidas de dimensiones individuales para cada espécimen.

Mediciones de fluoruro

La concentración de fluoruro en la saliva artificial se midió utilizando un electrodo selectivo de iones mezclando 0,5 ml de saliva artificial con 0,5 ml de solución TISAB. La salida de datos se convirtió a mg / l de ion fluoruro con referencia a los patrones de calibración de 0,1, 0,5, 1, 2 y 5 mg / l F^- , también se diluyó con cantidades iguales de TISAB.

Mediciones de resistencia a la tracción

La resistencia a la tracción indirecta se midió aplicando una fuerza diametral de compresión al espécimen cilíndrico hasta que se produjo la fractura, registrando la carga en la fractura y usando esta para calcular la resistencia a la tracción.

60 *Análisis estadístico*

La liberación acumulada de CHX y fluoruro en puntos de tiempo de 1 h, 24 h, 8 días, 15 días y 33 días, y resistencia a la tracción indirecta, se compararon utilizando ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de diferencias significativas de Tukey.

65

Morfología y estructura

Los especímenes que se habían analizado para determinar su resistencia a la tracción se recubrieron con una capa delgada de oro-paladio (SC7620, Emitech, Taiwán) y se examinó en un microscopio electrónico de barrido (Phenom, Eindhoven, Países Bajos). Las imágenes fueron obtenidas a aumentos nominales de 400, 1000 y 5000x.

La Tabla 9 muestra las propiedades de los GIC sustituidos y no sustituidos.

Tabla 9

	Contenido de NP (% en peso)	Propiedades de manipulación	Período de liberación de CHX	Período de liberación de F	Resistencia a la tracción diametral (MPa) (desviación estándar entre paréntesis)
Ejemplo 19	1	Bueno	> 33 días	> 33 días	14,3 (4,9)
Ejemplo 20	2	Bueno	> 33 días	> 33 días	15,7 (4,3)
Ejemplo 21	5	Bueno	> 33 días	> 33 días	15,5 (1,1)
Ejemplo 22	10	Bueno	> 33 días	> 33 días	11,5 (2,8)
Ejemplo 23	20	Bueno	> 33 días	> 33 días	9,4 (2,6)
Ejemplo 24	30	Escaso (descartado)	N/A	N/A	N/A
Ejemplo comparativo 11	0	Bueno	> 33 días	> 33 días	14,1 (3,7)

La tabla 10 muestra la liberación acumulada de CHX. Dentro de cada punto de tiempo, las letras indican grupos estadísticamente homogéneos, por lo tanto, las cifras con letras diferentes son estadísticamente diferentes a un nivel de confianza del 95 % en ese momento.

15

Tabla 10

	Liberación acumulada de CHX [nmol.mm⁻²] (desviación estándar entre paréntesis)				
	1h	24h	8 días	15 días	33 días
Ejemplo 19	0,16 (0,08)a,b	0,20 (0,09)a,b	0,48 (0,15)a,b	0,56 (0,16)a,b	0,65 (0,17)a,b
Ejemplo 20	0,66 (0,18)b	0,70 (0,19)b	1,04 (0,21)b	1,17 (0,22)b	1,30 (0,24)b
Ejemplo 21	1,30 (0,24)c	1,39 (0,25)c	2,03 (0,34)c	2,30 (0,36)c	2,51 (0,38)c
Ejemplo 22	2,52 (0,38)d	2,65 (0,40)d	3,40 (0,43)d	3,73 (0,44)d	4,01 (0,45)d
Ejemplo 23	4,02 (0,48)e	4,20 (0,50)e	5,09 (0,55)e	5,46 (0,59)e	5,94 (0,67)e
Ejemplo comparativo 11	0,01 (0,003)a	0,01 (0,02)a	0,11 (0,06)a	0,12 (0,07)a	0,16 (0,08)a

La tabla 11 muestra la liberación acumulada de fluoruro. Dentro de cada punto de tiempo, las letras indican grupos estadísticamente homogéneos, por lo tanto, las cifras con letras diferentes son estadísticamente diferentes a un nivel de confianza del 95 % en ese momento.

20

Tabla 11

	Liberación acumulada de fluoruro [ng.mm⁻²] (desviación estándar entre paréntesis)				
	1h	24h	8 días	15 días	33 días
Ejemplo 19	2,61 (1,11)b	18,59 (3,12)a,b	70,72 (8,40)a	106,9 (14,1)a	148,1 (16,6)a
Ejemplo 20	1,68 (0,73)b	17,10 (2,33)b	64,30 (7,68)a	101,1 (12,2)a	147,5 (15,7)a
Ejemplo 21	1,74 (0,70)b	19,31 (4,32)a,b	82,67 (7,49)a	124,2 (9,2)a	181,4 (14,0)a,b
Ejemplo 22	1,83 (0,96)b	18,73 (9,50)a,b	81,73 (30,22)a	122,8 (39,3)a	184,4 (49,8)a,b

(continuación)

	Liberación acumulada de fluoruro [ng.mm ⁻²] (desviación estándar entre paréntesis)				
	1h	24h	8 días	15 días	33 días
Ejemplo 23	2,09 (0,34) ^b	23,74 (5,89) ^{a,b}	81,73 (13,15) ^a	134,6 (19,2) ^a	204,4 (23,4) ^b
Ejemplo comparativo 11	7,38 (1,69) ^a	27,65 (0,85) ^a	85,82 (5,68) ^a	119,9 (11,0) ^a	154,5 (14,3) ^{a,b}

Visión general

5 Los especímenes de GIC con sustituciones de 1, 2, 5, 10 y 20 % en peso de nanopartículas de CHX-HMP para polvo de vidrio se crearon con éxito y se compararon con GIC no modificados (0 % en peso de sustitución). Aquellos con sustitución del 30 % en peso de nanopartículas de CHX-HMP fueron más frágiles y difíciles de manipular y se descartaron.

Liberación de clorhexidina

10 La liberación de CHX en 791 h (33 días) normalizada al área de superficie se puede ver en la Figura 16. La liberación de CHX persistió durante la duración del estudio y no había alcanzado una meseta clara en el punto de tiempo de medición final. Una respuesta a la dosis fue evidente en cuanto a que los especímenes con una mayor sustitución de CHX-NP exhibieron una mayor liberación de CHX, aunque la relación no fue directamente proporcional.

15 La liberación acumulada de CHX a las 1 y 24 h y a los 8, 15 y 33 días para los 6 grupos de especímenes y el resultado de los análisis estadísticos se muestran en la Tabla 10. El resultado fue el mismo para cada punto de tiempo en que 0 % en peso y 1 % en peso no fueron estadísticamente significativamente diferentes entre sí, y 1 % en peso y 2 % en peso no fueron estadísticamente significativamente diferentes entre sí, pero todos los demás emparejamientos fueron significativamente diferentes, lo que indica un claro aumento en la liberación de clorhexidina correlacionada con un aumento en la sustitución de nanopartículas en todos los tiempos medidos.

Liberación de fluoruro

25 En la Figura 17 se puede ver la liberación de fluoruro durante 791 h (33 días) normalizada al área de superficie. Todos los especímenes de GIC liberaron fluoruro continuamente durante la duración del experimento. La velocidad de liberación inicial fue la más rápida y se fue desacelerando gradualmente durante el período experimental.

30 La liberación acumulada de fluoruro a las 1 y 24 horas y a los 8, 15 y 33 días para los 6 grupos de muestras y el resultado del análisis estadístico se muestra en la Tabla 11. A 1 h, el GIC no modificado liberó significativamente más fluoruro que el fluoruro sustituido, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes sustituciones. En épocas posteriores hubo pocas diferencias y la liberación de fluoruro fue muy similar para todas las muestras de GIC y no varió en función de la sustitución de nanopartículas.

Resistencia a la tracción

35 La resistencia a la tracción diametral de los 6 grupos de especímenes se muestra en la Tabla 3. El ANOVA dio un valor de p de 0,054, lo que indica que, aunque hubo una tendencia numérica hacia una menor resistencia a la tracción para el 10 y el 20 % en peso de cementos de sustitución, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre estos valores y los de los otros GIC.

Morfología y estructura

45 En la Figura 18 se muestran las micrografías electrónicas de barrido de especímenes de GIC representativos. El aspecto de los especímenes de GIC con diferentes sustituciones de nanopartículas fue indistinguible, con las partículas de carga de vidrio y la matriz circundante claramente visible. Solo el 20 % en peso de sustitución de nanopartículas exhibió un aspecto ligeramente diferente (Figura 18f), con evidencia de partículas más pequeñas o agregados de nanopartículas.

Conclusión

50 Al añadir nanopartículas de CHX-HMP a un GIC comercial, se ha demostrado que es posible crear un material que libere CHX durante un período prolongado de manera dependiente de la dosis. Dado que la CHX es eficaz contra una amplia gama de bacterias y levaduras, esto confiere propiedades antimicrobianas y anti-caries en estos nuevos materiales de relleno dentales nanofuncionalizados. Las sustituciones de hasta el 5 % en peso parecían no tener un efecto perjudicial significativo sobre la resistencia a la tracción (Tabla 9) de los cementos. Las sustituciones más

altas pueden conducir a una reducción de la resistencia a la tracción, aunque esto no fue estadísticamente significativo; al 20 % en peso, fue posible ver algunas morfologías diferentes dentro de la estructura del cemento (Figura 18), lo que indica la presencia de nanopartículas y agregados de nanopartículas. Estas sustituciones más altas podrían llevar a una reducción en la resistencia, ya que no se puede suponer que interactúen con el políacido de la misma manera que las partículas de relleno de vidrio. Los GIC nanofuncionalizados mostraron el mismo perfil de liberación de fluoruro que los cementos no modificados.

El uso de las nanopartículas de CHX-HMP descritas en el presente documento, a diferencia de otros enfoques, tal como el uso de diacetato de CHX triturado o una solución acuosa de digluconato de CHX, ofrece la ventaja de que la liberación de CHX se mantiene por mucho más tiempo con los GIC (Figura 16). Las resinas compuestas suplementadas con diacetato de CHX pulverizado mostraron una liberación de CHX que alcanzó una meseta después de aproximadamente 7 días (Dent Mater, vol. 28, pp. 573-583, 2012), en comparación con una liberación continuada de al menos 33 días que se ha visto en el presente documento.

Se han indicado GIC suplementados con polvo de diacetato CHX o solución de digluconato CHX (J Esthet Restor Dent, vol. 20, pp. 29-44; discusión 45, 2008), y estos inhibieron el crecimiento de varios microorganismos orales. La liberación de CHX de estos GIC no se midió directamente. La mayoría de los especímenes no mostraron un comportamiento antimicrobiano después de 60-90 días. El pico de eficacia en estos GIC conocidos fueron las primeras 24 h para todas las muestras de GIC, lo que sugiere que la mayoría de CHX se libera durante este período inicial. La liberación de CHX más extendida observada en los GIC que incorporan MNP de las presentes propuestas conduce a una eficacia antimicrobiana más prolongada.

Ejemplo 25 - Microbiología en muestras de EVA funcionalizadas con nanopartículas de CHX

Los especímenes de EVA se funcionalizaron mediante una inmersión de 30 s en una suspensión coloidal de CHX-HMP-5 en agua, seguido de una inmersión de 10 s en agua desionizada ("baja concentración") o sin una posterior inmersión en agua desionizada ("alta concentración"). Estas muestras se expusieron después a cultivos de bacterias SARM. Luego se sumergieron en 1 ml de medio de crecimiento y se incubaron durante 18 h. De acuerdo con los experimentos de liberación en este tiempo, el espécimen de EVA debe liberar aproximadamente 6 μM por m^2 de material. El área de superficie de la muestra fue de 0,000182 m^2 , por lo que la liberación total esperada debería ser de CHX 1,1 nM en 1 ml, dando una concentración resultante de CHX 1,1 μM .

Estos especímenes, que dieron como resultado una concentración de CHX de aproximadamente de 1,1 μM , no tenía SARM recuperable. Sin embargo, un tratamiento similar con una solución de CHX 25 μM (a diferencia de la suspensión de CHX-HMP-5) no fue eficaz contra SARM. Estos resultados indican que las nanopartículas fueron eficaces contra SARM y que las propias nanopartículas pueden exhibir algún efecto antibacteriano adicional además del atribuible al CHX liberado. Esto puede deberse a una concentración mucho mayor de CHX localizada que es más alta cerca de la superficie del material; y / o las nanopartículas que tienen actividad antimicrobiana inherente.

Ejemplo 26 - Microbiología en muestras de titanio funcionalizadas con nanopartículas de CHX

Los especímenes de titanio funcionalizados con CHX-HMP-5 también se expusieron a cultivos de bacterias *Streptococcus gordonii*. Las muestras se sumergieron en 2 ml de medio de crecimiento y se incubaron durante un máximo de 48 h. De acuerdo con los experimentos de liberación, esto debería resultar en una liberación de aproximadamente 7 μM por m^2 . El área de superficie del fue de 0,00024 m^2 , por lo que la liberación esperada debe ser de 1,7 nM de CHX en 2 ml, lo que da una concentración resultante de 0,8 μM de CHX.

La superficie de titanio funcionalizada con nanopartículas eliminó las bacterias en la muestra.

La CMI para *S. mutans* (una bacteria *Streptococcus* grampositiva similar a *S. gordonii* también implicada en la caries dental) se ha informado como 0,125 % de digluconato de CHX en masa, que corresponde a aproximadamente 1,4 mM, es decir, cuatro órdenes de magnitud más altos que la concentración de CHX efectuada por los especímenes presentes.

Estos resultados sugieren que las propias nanopartículas exhiben algún efecto antimicrobiano inherente más allá de la liberación de CHX soluble en la solución a granel.

Ejemplo 27 - Propiedades de MNP de CHX-HMP

En el presente documento se proporciona evidencia directa sobre la composición y la estequiometría y el tamaño y las propiedades de agregación de las MNP de CHX-HMP.

Se ha llevado a cabo un análisis TEM de las MNP, específicamente las composiciones de CHX-HMP-5 y CHX-HMP-0,5, (FIG. 23). Las NP de CHX-HMP-5 y CHX-HMP-0,5 se depositaron sobre mallas de cobre recubiertos con carbono Agar Scientific Ltd., Essex, Reino Unido) y se sometieron a TEM y EDX (Jeol 120 kV 1200 Mk2; Jeol, Tokio, Japón). Las mallas de TEM se sumergieron en suspensiones de NP durante 2 segundos, se enjuagaron en agua

desionizada durante 2 segundos y se dejaron secar al aire.

Las MNP a menudo se encontraban en agregados de gran tamaño. La figura 23 muestra un ejemplo de una muestra de CHX-HMP-0,5 a la izquierda y una muestra de CHX-HMP-5 a la derecha. La imagen de la muestra de mayor concentración muestra que se pueden ver MNP en la periferia de un agregado (parte superior derecha de la imagen), con buena visibilidad de nanopartículas individuales. Dos ejemplos de nanopartículas separadas individuales están indicadas por flechas. Las TEM sugiere que las MNP a menudo se fusionan, y no solo se mantienen electrostáticamente (véase especialmente la imagen de la muestra de menor concentración). También se observaron algunos agregados muy pequeños.

EDX se llevó a cabo MNP de CHX-HMP en mallas de TEM para investigar la composición de las MNP. Se observaron tanto Cl (de CHX) como P (de HMP) en los espectros, confirmando que las MNP están compuestas de CHX y HMP. Las señales de Cu y Au se atribuyen a la malla de TEM en la que se depositaron las MNP.

Se han realizado mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) y del potencial zeta (Zetasizer NanoZS; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido) (FIG. 24 y FIG. 25, respectivamente). Las suspensiones de CHX-HMP-5 contenían algunos agregados de sedimentación, por lo tanto, se dejó que el espécimen se asentara antes de analizar el sobrenadante. Cada valor numérico reportado es el promedio de las 3 mediciones representadas gráficamente; cada medición se llevó a cabo en una suspensión de nanopartículas diferente. Los tamaños de partícula medidos usando DLS fueron diferentes para CHX-HMP-5 y CHX-HMP-0,5, dando valores promedio de 202 y 140 nm, respectivamente. Los valores obtenidos por DLS fueron ligeramente más grandes que los revelados por TEM (el análisis de TEM sugirió valores de aproximadamente 40-80 nm), lo que se considera un resultado de la agregación observada por TEM (discutido anteriormente). Esto está respaldado por la observación de que las partículas normalmente formaban agregados más grandes en la suspensión de mayor concentración. Las mediciones del potencial zeta revelaron que ambas concentraciones de MNP estaban cargadas negativamente; CHX-HMP-5 tenía una carga neta mayor que CHX-HMP-0,5 (-50,8 y -42,2 mV, respectivamente).

El análisis elemental del precipitado de CHX-HMP-5 indicó que las nanopartículas están compuestas por una relación de 3 iones de CHX a 1 ion de HMP.

Ejemplos 28-29 y Ejemplos comparativos 12-13 - Materiales compuestos: películas para apósitos para heridas

Se han creado películas de polisacáridos naturales de CMC (ejemplo comparativo 12) y alginato (ejemplo comparativo 13). En películas equivalentes, las nanopartículas de CHX-HMP-5 se han incorporado a diferentes dosis (ejemplos 28-29). Estas películas son prometedoras para su uso en nuevos apósitos antimicrobianos para heridas.

Se preparó una solución acuosa al 5 % en peso de alginato añadiendo alginato seco (Protanal® LF 10/60 FT, FMC Biopolymers) a una suspensión acuosa de agitación rápida de nanopartículas de hexametáfosfato de clorhexidina equivalente al 6 % en peso, 3 % en peso o 0 % en peso. Estas soluciones se vertieron en placas de Petri ($\Phi = 90$ mm) y el agua se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió CaCl_2 (30 ml, 2 % en peso ac.) a las placas de Petri y se permitió la reticulación durante 25 min. Las películas de alginato reticulado se retiraron de las placas de Petri, se lavaron con agua destilada y se secaron al aire sobre parafilm.

Se preparó una solución acuosa al 5 % en peso de carboximetilcelulosa (CMC) se preparó añadiendo CMC seca (tres tipos: Pm = 90.000, 250.000 y 700.000 con 0,7, 0,7 y 0,9 Los grupos de CM por unidad de glucosa anhidra respectivamente) a una suspensión acuosa de nanopartículas de hexametáfosfato de clorhexidina en agitación rápida equivalente al 6 % en peso, 3 % en peso o 0 % en peso. Estas soluciones se vertieron en placas de Petri ($\Phi = 90$ mm) y el agua se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 4 días. Se añadieron 15 ml de etanol para cubrir cada película y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Se añadió una segunda cubierta de 15 ml de etanol a las placas de Petri, lo que permitió retirar las películas. Posteriormente se colocaron en parafilm y se secaron al aire.

Se colocaron secciones de películas de $3,32 \text{ mm}^2$ (alginato) o $5,00 \text{ mm}^2$ (CMC) en semi-microcubetas, se cubrieron con agua (2,2 ml) y las cubetas selladas con tapas y parafilm. Las cubetas se agitaron con un agitador orbital (150 rpm) y la absorbancia (255 nm) se midió una vez cada 24 horas y se comparó con la de los patrones de digluconato de clorhexidina de acuerdo con los protocolos estándar. Se demostró que las NP de CHX-HMP sobrevivieron al proceso de reticulación dentro de las películas de alginato, confirmado por FT-IR por la presencia de un pico a 1492 cm^{-1} y un hombro a 1530 cm^{-1} correspondiente a los dos picos principales en el espectro de CHX-HMP.

Se descubrió que la CMC se disuelve rápidamente en la inmersión en agua, disgregando y liberando toda la CHX durante un período de aproximadamente 10 minutos. La liberación de CHX se completó en minutos y fue dependiente de la dosis, con las películas que contienen % en peso de MNP que muestran un mayor tiempo para completar la liberación (FIG. 26).

El alginato por contraste no se disgregó y liberó CHX durante un período de 7 días (Figura 27). La liberación de CHX continuó durante un período de 5 a 7 días y fue dependiente de la dosis, ya que incorporó más MNP liberadas en

una liberación de CHX más alta. Esto ofrece la posibilidad de controlar la liberación seleccionando una dosis adecuada de MNP.

Ejemplo 30 y Ejemplo comparativo 14: eficacia antimicrobiana de los apósitos para heridas

5 Las películas de alginato MNP del ejemplo 28 se han probado en ensayos antimicrobianos. Los microorganismos de prueba se consideran muy relevantes para la infección de la herida: SARM, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acenitobacter baumannii*. [Acenitobacter baumannii es el primer microbio que se ha indicado que tiene una resistencia contra CHX por medio de un canal de transporte de iones en la membrana celular. No es un patógeno extendido, pero se encuentra particularmente en los hospitales de las fuerzas armadas.]

10 Las películas también se probaron contra secciones de un apósito disponible comercialmente que contiene nanopartículas de plata (ejemplo comparativo 14).

15 La Tabla 12 muestra las zonas de inhibición para los apósitos experimentales compuestos de alginato de MNP de CHX-HMP para 5 patógenos asociados a la herida en comparación con un apósito comercial a base de plata, e indican que, para SARM, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, los apósitos de MNP inhiben el crecimiento bacteriano en mayor medida que el apósito comercial.

20 El apósito de plata tiene una zona de inhibición más grande que los apósitos de MNP para *A. baumannii*, pero se considera alentador que las películas de NP inhiban el crecimiento de este microbio, ya que tiene una resistencia reconocida a CHX.

Tabla 12.

	SARM	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>
0 % en peso de MNP	0	0	0	0	0
3 % en peso de MNP	21,0 (0,9)	18,4 (1,5)	13,5 (0,4)	15,6 (0,7)	13,0 (0,7)
6 % en peso de MNP	22,6 (1,9)	19,9 (1,6)	14,2 (0,4)	16,5 (0,6)	14,9 (1,0)
Apósito de Ag	15,4 (0,5)	12,1 (0,7)	12,1 (0,7)	11,9 (0,7)	16,1 (2,4)

25 **Ejemplo 31 - Materiales compuestos: cementos de ionómero de vidrio**

Se han producido cementos de ionómero de vidrio que contienen MNP de CHX-HMP. Se han desarrollado dos métodos para secuestrar las MNP y hacerlas adecuadas para la inclusión en el GIC:

- 30 (i) un método húmedo mediante el cual se hace que las MNP se sedimenten fuera del coloide y se utiliza la centrifugación para permitir que el operador decante el sobrenadante dejando una pasta blanca espesa, y
 (ii) secado seguido de molienda con bolas para obtener un polvo blanco. Los productos de ambos métodos se han incorporado en un GIC comercial para la medición de varias propiedades.

35 Ejemplo 32 - Materiales de recubrimiento superficial: Catéteres de poliuretano Los sustratos y catéteres de poliuretano se han sido recubiertos con MNP de CHX-HMP-5.

40 Es deseable que esta aplicación demuestre la liberación a largo plazo (> 3 meses) de CHX. Se ha demostrado la liberación de CHX de al menos 85 días (Figura 28).

45 La densidad de recubrimiento se ha investigado cambiando la concentración de reactivo (50 mM de CHX y HMP) y el régimen de recubrimiento por inmersión (1,5 y 10 repeticiones por inmersión). Se ha descubierto que los tiempos de inmersión más largos dan como resultado una mayor liberación y que la concentración de NP 50 mM en la mayoría de los casos libera una concentración de más de 5 mM. Más inmersiones producen una mayor densidad de recubrimiento (FIG. 29). Los datos iniciales sugieren que, en algunos casos, se ha observado una menor liberación de CHX para especímenes recubiertos más densamente, lo cual puede explicarse, sin pretender quedar ligados a teoría alguna, observando que es posible que los especímenes recubiertos más pesados puedan ser menos porosos, por lo que presentan menos área de superficie del material activo al ambiente, o pueden estar relacionadas con el desprendimiento del recubrimiento, aunque esto no se ha observado directamente.

50 Parece que las capas de inmersión repetidas y / o el cambio del tiempo de recubrimiento por inmersión permiten el control de la dosis de MNP.

55

Ejemplos 33-36 y ejemplos comparativos 15-22: eficacia de inhibición de microbios para muestras que contienen poliuretano

También se ha completado un extenso trabajo de microbiología. La Tabla 13 muestra el crecimiento de microorganismos en especímenes de poliuretano con diferentes tratamientos de superficie después de 24 horas de incubación en medio de crecimiento de bacterias. Clave: - inhibición completa; + crecimiento ligero (crecimiento observado en diluciones entre 10^{-1} - 10^{-3}); ++ crecimiento moderado (crecimiento observado en diluciones entre 10^{-4} - 10^{-6}); +++ alto crecimiento (crecimiento en diluciones entre 10^{-7} - 10^{-12}). Los especímenes de poliuretano recubiertos con CHX-HMP-50 no mostraron crecimiento de SARM, *E. coli* y *P. aeruginosa* y una reducción en el crecimiento de *K. pneumoniae* (ejemplos 33-36) en comparación con los controles tratados con agua (ejemplos comparativos 15-18) o una solución acuosa de CHX (ejemplos comparativos 19-22).

Tabla 13.

	SARM	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Control	++	++	+++	+++
Pu recubierto con CHX-HMP-50	-	-	-	++
CHX 80 μ M	++	++	++	++

Ejemplo 37-44 y ejemplos comparativos 23-26 - Tinción de vivas-muertas

La tinción de vivas y muertas también se ha llevado a cabo utilizando los microorganismos enumerados en los ejemplos 33-36 anteriores. Las secciones de poliuretano se recubrieron primero con NP (CHX-HMP-5 y CHX-HMP-50) mediante recubrimiento por inmersión durante 30 segundos y enjuagando durante 10 s y luego se sumergieron en la suspensión bacteriana correspondiente durante 24 h. Para la tinción se utilizaron tinciones de vivas / muertas de SYTO 9 y yoduro de propidio.

Las áreas más claras e la figura 30 indican áreas de crecimiento de microbios. Por tanto, se observan altos niveles de crecimiento de microbios en el control no tratado (ejemplos comparativos 23-26, columna más a la izquierda de la figura 30). Estas imágenes muestran el efecto de las MNP sobre el crecimiento microbiano (columnas central y derecha de la Figura 30) e indican que el crecimiento microbiano se reduce radicalmente por la presencia de las MNP en cualquiera de las concentraciones (ejemplos 37-44). Tenga en cuenta que las MNP captan algo del tinte fluorescente, que pueden verse como áreas brillantes en las imágenes del CHX-HMP-50 (ejemplos 41-44).

Ejemplos 45-50 y Ejemplos comparativos 27-32 - Materiales con recubrimiento superficial: siliconas médicas

Las siliconas se utilizan como prótesis y otros dispositivos de biomaterial en todo el cuerpo. El enfoque particular de este ejemplo son las siliconas usadas en la cavidad oral, en la construcción de obturadores palatinos (dispositivos utilizados para corregir defectos en el paladar debido a cirugías o anomalías del desarrollo) y dentaduras postizas.

Estas siliconas se colonizan fácilmente por microbios y levaduras patogénicos, particularmente *Candida albicans*. Se ha investigado la adhesión de MNP de CHX-X a una silicona médica. La carga microbiana en estos dispositivos es particularmente alta y, por esta razón, pueden ser necesarias dosis más altas de CHX. Por tanto, se han desarrollado formulaciones distintas de CHX-HMP.

La liberación de CHX a partir de tres formulaciones (CHX-HMP-5, CHX-TMP-5 y CHX-TP-5) se ha investigado después de recubrir por inmersión de siliconas orales por un intervalo de tiempo de 1 minuto a 6 horas. El cuerpo (B) y el sellador (S) representan dos tipos diferentes de silicona, tal como se suministran. El medio de elución se refrescó a las 8 semanas para tener en cuenta cualquier saturación.

Específicamente, especímenes de silicona de "cuerpo" y "sellador" que se utilizan durante el recubrimiento blando de la prótesis y la construcción del obturador (Mucopren® Soft; Kettenbach, Eschenburg, Alemania), se crearon utilizando moldes de silicona de 5 x 8 x 2,5 mm. Los moldes se engrasaron usando vaselina de petróleo, la silicona se envasó en los moldes y se dejó curar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los especímenes se extrajeron de los moldes y se sometieron a ultrasonidos en etanol al 70 % durante 10 minutos, se secaron al aire durante 15 minutos y se almacenaron secos en recipientes herméticos.

La liberación de CHX a partir de tres formulaciones (CHX-HMP-5, CHX-TMP-5 y CHX-TP-5) se investigó después del recubrimiento por inmersión de siliconas orales durante un intervalo de tiempo de 1 minuto a 6 horas. Los especímenes se sumergieron en suspensiones de NP agitadas (con la excepción de TMP, que forma una sustancia pegajosa viscosa que no se puede agitar) durante el tiempo asignado, se enjuagó en agua desionizada durante 10 s y se secó al aire. Se sumergieron grupos adicionales de n = 10 especímenes en solución de digluconato de clorhexidina 25 μ M (la concentración residual de clorhexidina en solución acuosa después de la formación de nanopartículas) durante 6 horas para proporcionar un control positivo. Esto se denomina CHX-C.

5 Como se muestra en la Figura 31, los especímenes recubiertos con MNP de CHX-HMP mostraron una liberación gradual de CHX a lo largo del período experimental. La velocidad de liberación disminuyó con el tiempo, pero cuando la saliva artificial fue reemplazada, la velocidad se incrementó nuevamente, lo que sugiere que el grado de saturación de la saliva artificial con respecto a la sal de CHX estaba dificultando la liberación de CHX antes de que se refrescara la saliva artificial. La liberación de CHX fue sostenida, en contraste con las otras dos sales, que se analiza a continuación. La liberación de CHX a partir de muestras recubiertas con CHX-HMP varió según el tiempo de recubrimiento, con un aumento en la CHX observada con un mayor tiempo de recubrimiento (pero la relación no fue lineal). Se observó más liberación de CHX en la silicona corporal que en la silicona sellante.

10 Como se muestra en la Figura 32, los especímenes recubiertos con MNP de CHX-TP exhibieron un perfil de liberación de CHX bastante diferente al de las MNP de CHX-HMP, observándose la mayoría o toda la liberación de CHX observada en el periodo de las primeras 24 horas. Se observó una pequeña liberación adicional de CHX tras el cambio de saliva artificial, pero de nuevo, esta pequeña liberación se completó dentro de las primeras 24 h después de la introducción de la saliva artificial. Por tanto, esta formulación de las MNP mostró una liberación mayor que la de CHX-HMP con aproximadamente 3 veces la liberación de CHX, pero esta liberación tuvo una vida corta. La liberación de CHX a partir de especímenes recubiertos con CHX-HMP varió según el tiempo de recubrimiento, con un aumento en la CHX un mayor tiempo de recubrimiento (pero la relación no fue lineal). La liberación de CHX fue similar a la de las siliconas corporales y sellantes.

20 Como se muestra en la Figura 33, los especímenes recubiertos con MNP de CHX-TMP, como los recubiertos con MNP de CHX-TP, exhibieron la mayoría o toda la liberación de CHX dentro de las primeras 24 horas de exposición a saliva artificial, tanto en la salida como después de refrescar la saliva artificial. El tiempo de recubrimiento efectuó la liberación de CHX pero de manera diferente a las otras sales: la mayor liberación de CHX se observó en aquellos especímenes recubiertos durante 30 minutos, mientras que los especímenes recubiertos 2 h y 6 h mostraron una liberación intermedia de CHX y los especímenes recubiertos 1 min tuvieron la liberación de CHX más pequeña. Se observó más liberación de CHX a partir de silicona sellante que de silicona corporal.

30 Cabe destacar que parece haber un margen para controlar la dosis y la duración de la liberación de CHX seleccionando diferentes aniones (HMP, TMP, TP) y tiempo de inmersión. También se observó que el recubrimiento de las siliconas con MNP no aumentó significativamente su absorción de agua; la absorción de agua es perjudicial para el rendimiento de estas siliconas y se ha observado como un efecto secundario de otros intentos de conferirles propiedades antimicrobianas. Esta es una ventaja adicional demostrada por las MNP de la invención.

35 Las propiedades antifúngicas de las MNP se han investigado. Los experimentos iniciales han demostrado consistentemente una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de *C. albicans*, después de la siembra con las MNP de CHX-HMP, con una reducción en el crecimiento de hongos visto a la 1 h y sin crecimiento a las 4 h.

Ejemplo 51 y Ejemplo comparativo 33 - Materiales con recubrimiento superficial: implantes de titanio

40 Las MNP de CHX-HMP se han utilizado para recubrir titanio para desarrollar recubrimientos antimicrobianos para implantes.

45 Los sustratos de titanio recubiertos con MNP CHX-HMP-5 (preparados por inmersión en suspensión CHX-HMP-5 durante 30 s, enjuagados en agua desionizada durante 10 s, luego secados) se ha demostrado que inhiben el crecimiento de *Streptococcus gordonii* y *Porphyromonas gingivalis*. Además, cuando los sustratos de titanio están recubiertos con una película salival, una película proteica que recubre cualquier material colocado en la boca, el efecto antimicrobiano no se ve obstaculizado. Los datos representativos de las unidades formadoras de colonias de *S. gordonii* sobre superficies de titanio con (ejemplo 51) y sin (ejemplo comparativo 33) MNP de CHX-HMP se muestran en la FIG. 34.

Ejemplos 52-54 y ejemplos comparativos 34-36 - Productos para el cuidado oral y tratamientos tópicos

55 La CHX en solución acuosa ya está en uso en odontología. Está disponible en supermercados y farmacias como un colutorio bucal 2,2 mM adecuado para controlar la placa y la enfermedad periodontal / irritación de las encías. También se utiliza como agente antimicrobiano tópico en muchas aplicaciones, como la enfermedad periodontal más avanzada, durante la cirugía oral, durante el tratamiento endodóntico.

60 Este ejemplo muestra que la liberación de CHX como MNP de CHX-HMP, en lugar de en solución acuosa, cambia el liberación de CHX.

65 Se utilizaron discos de hidroxiapatita (n = 6 por grupo) como sustituto del tejido dental. Se prepararon tres soluciones acuosas de digluconato de CHX, 1, 2,2 y 5 mM (ejemplos comparativos 34-36, respectivamente). Se prepararon tres suspensiones de MNP de CHX-HMP con concentraciones totales pareadas, así con 1, 2,2, 5 mM de CHX y HMP (ejemplos 52-54, respectivamente). Los discos de hidroxiapatita se sumergieron en la preparación durante 15 s, se enjuagaron y la liberación de CHX se observó en función del tiempo (FIG. 35).

Una liberación de CHX más prolongada y en general más grande se observó en discos tratados con suspensiones de MNP que en soluciones acuosas. Los discos tratados con MNP de CHX-HMP mostraron una liberación de CHX más prolongada y mayor, lo que indica que se retuvo más CHX cuando estaba en forma MNP que cuando se liberó en solución. Esto tiene potencial en el desarrollo de productos orales de venta libre y / o agentes tópicos para uso profesional para conferir un ambiente oral antimicrobiano mucho más duradero.

Ejemplo 55 y Ejemplo comparativo 37 - Pinturas antimicrobianas

Se han llevado a cabo métodos para secuestrar las MNP como una pasta adecuada para uso en pinturas antimicrobianas y se han creado prototipos con un 25 % en masa de pasta de MNP en una pintura de emulsión, y se han comparado con una pintura antimicrobiana líder en el mercado (Dulux Sterishield).

La pasta de NP se creó preparando 400 ml de CHX-HMP-5 mezclando 200 ml de digluconato de CHX 10 mM con 200 ml de HMP de sodio 10 mM a temperatura ambiente y presión durante mezcla enérgica. Se añadieron aproximadamente 50 ml de KCl 1 M y luego se detuvo la agitación. Se dejó sedimentar la mezcla resultante y se descartó el sobrenadante transparente superior ~ 300 ml. El líquido restante se centrifugó durante 20 minutos a 5000 rpm en una centrífuga de sobremesa, lo que resultó en la separación del sobrenadante y una pasta blanca viscosa con una consistencia entre la pintura y la pasta de dientes. El sobrenadante se desechó nuevamente y la pasta se retiró de los tubos y se usó.

La pintura experimental fue viable (ejemplo 55, FIG. 36, imagen de la derecha), secando aparentemente normalmente (a ojo) y con un acabado superficial similar a la pintura no modificada (ejemplo comparativo 37, figura 36, imagen de la izquierda).

Ejemplos 56-57 y Ejemplos comparativos 38-41 - Eficacia de la inhibición de microbios en pinturas antimicrobianas

Se investigó el crecimiento de SARM y *E. coli* en las pinturas de control negativo (emulsión no modificada, ejemplos comparativos 38-39), experimentales (dopadas con NP) y control positivo (Sterishield, ejemplos comparativos 40-41) después de 24 horas de incubación en los cultivos bacterianos. Los cubreobjetos de vidrio se recubrieron en ambos lados con una sola capa de pinturas y se dejaron secar.

Para SARM, Sterishield efectuó una reducción de 10 veces en el crecimiento de SARM, pero la pintura de MNP efectuó una reducción de 1000 veces en la misma (FIG. 37).

Para *E. coli*, Sterishield no tuvo efecto en el crecimiento bacteriano, mientras que la pintura de MNP eliminó el crecimiento de *E. coli* sin bacterias recuperables (Figura 37).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana que comprende una sal de clorhexidina, en la que el anión en la sal se selecciona de entre: fosfatos seleccionados de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato y la serie homóloga de polifosfatos que comienza con pirofosfato.
- 10 2. Una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana de la reivindicación 1, en la que el anión en la sal es:
seleccionado de pirofosfato, trifosfato y hexametafosfato; o
seleccionado de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos.
- 15 3. Una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la sal es hexametafosfato de clorhexidina.
- 20 4. Una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos una dimensión de la micropartícula o nanopartícula es de 20 a 200 nm.
5. Una suspensión coloidal que comprende la micropartícula o nanopartícula antimicrobiana de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 6. Una suspensión coloidal de la reivindicación 5, en la que los coloides están dispersos en agua o en una solución acuosa.
7. Una suspensión coloidal de las reivindicaciones 5 o 6, en la que el valor absoluto del potencial zeta (ζ) es al menos 20 mV.
- 30 8. Un artículo médico que comprende micropartículas o nanopartículas antimicrobianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Un artículo médico de la reivindicación 8, en donde el artículo es un catéter venoso, un catéter urinario, un implante dental, un protector bucal, dentaduras postizas, apósitos para heridas o embalajes médicos.
- 35 10. Un material compuesto que comprende micropartículas o nanopartículas antimicrobianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
11. Un material compuesto de la reivindicación 10, que es un cemento dental, una pintura o una composición para el cuidado bucal.
- 40 12. Un material compuesto de las reivindicaciones 10 u 11, que comprende micropartículas o nanopartículas antimicrobianas en una cantidad del 1 % en peso al 60 % en peso del compuesto global.
13. Un material compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que es un cemento de ionómero de vidrio (GIC).
- 45 14. Un método para hacer una micropartícula o nanopartícula antimicrobiana que comprende hacer reaccionar una solución acuosa que comprende cationes de clorhexidina con un anión seleccionado de: fosfatos seleccionados de la serie homóloga de metafosfatos cíclicos que comienza con trimetafosfato, y la serie homóloga de polifosfatos que comienza con pirofosfato;
en una proporción de 1:100 a 100:1 para producir una suspensión coloidal de micropartículas o nanopartículas.
- 50

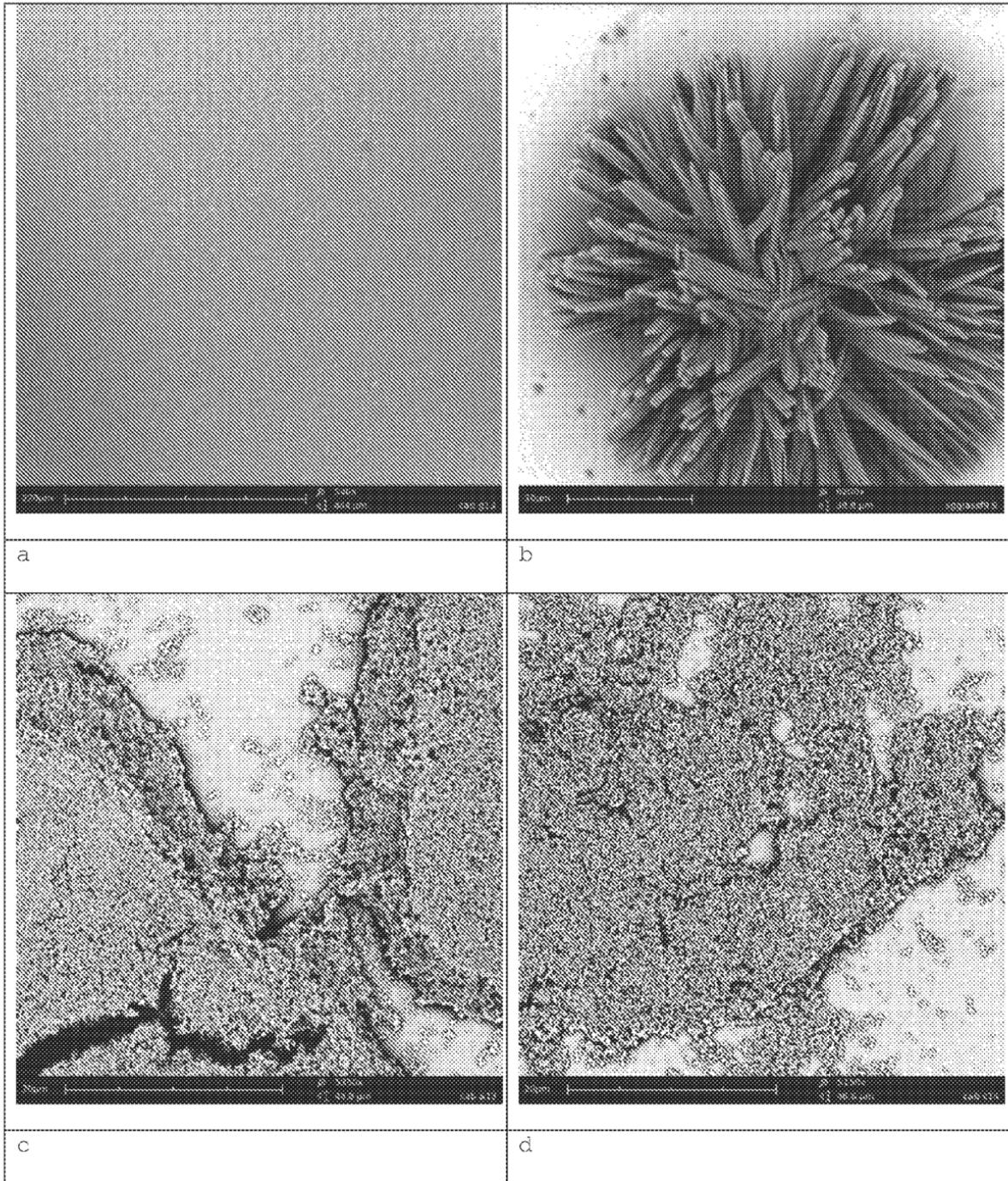


FIG. 1

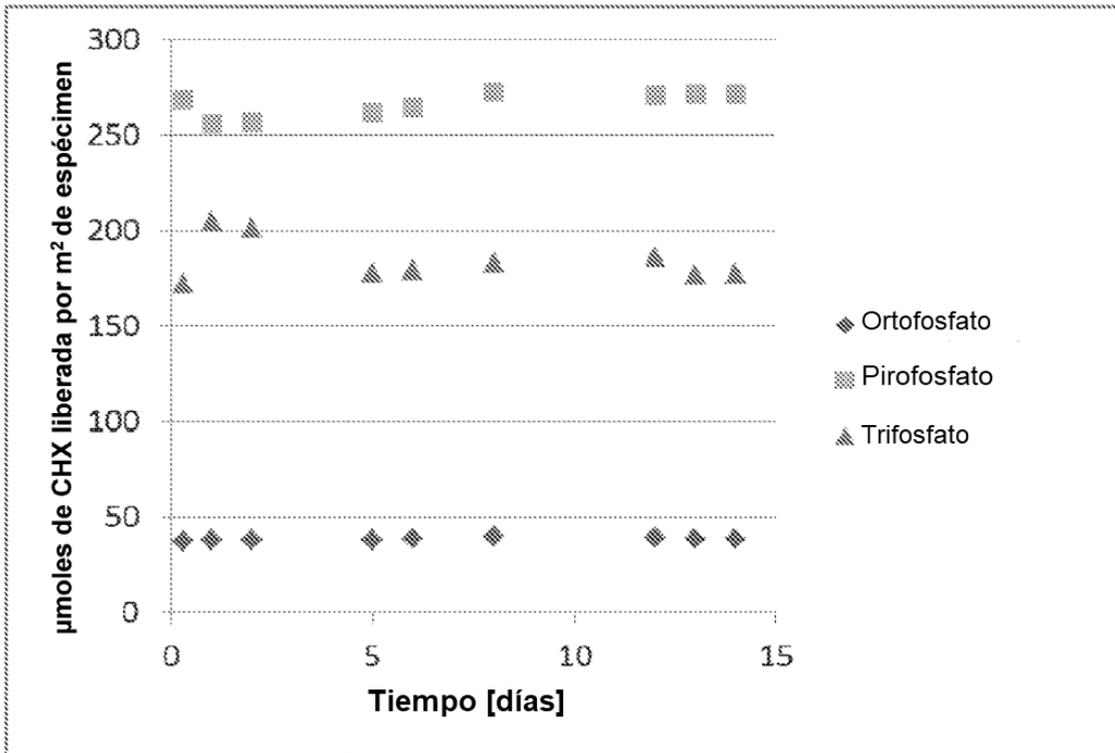


FIG. 3

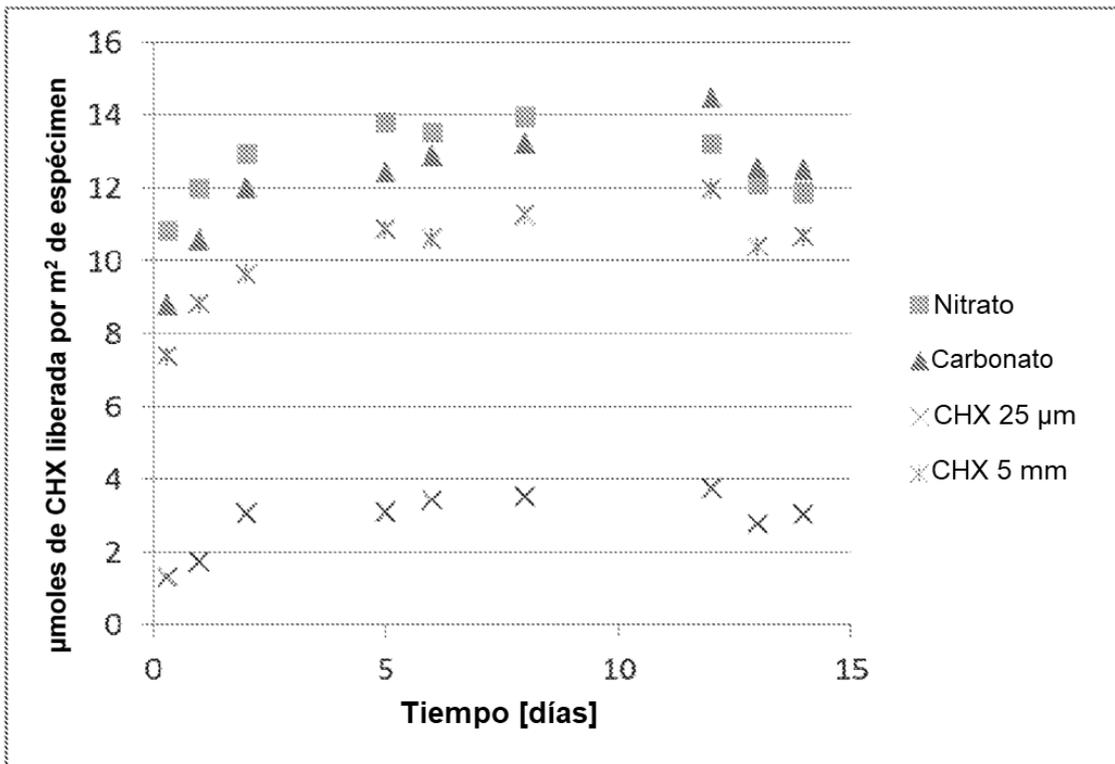


FIG. 4

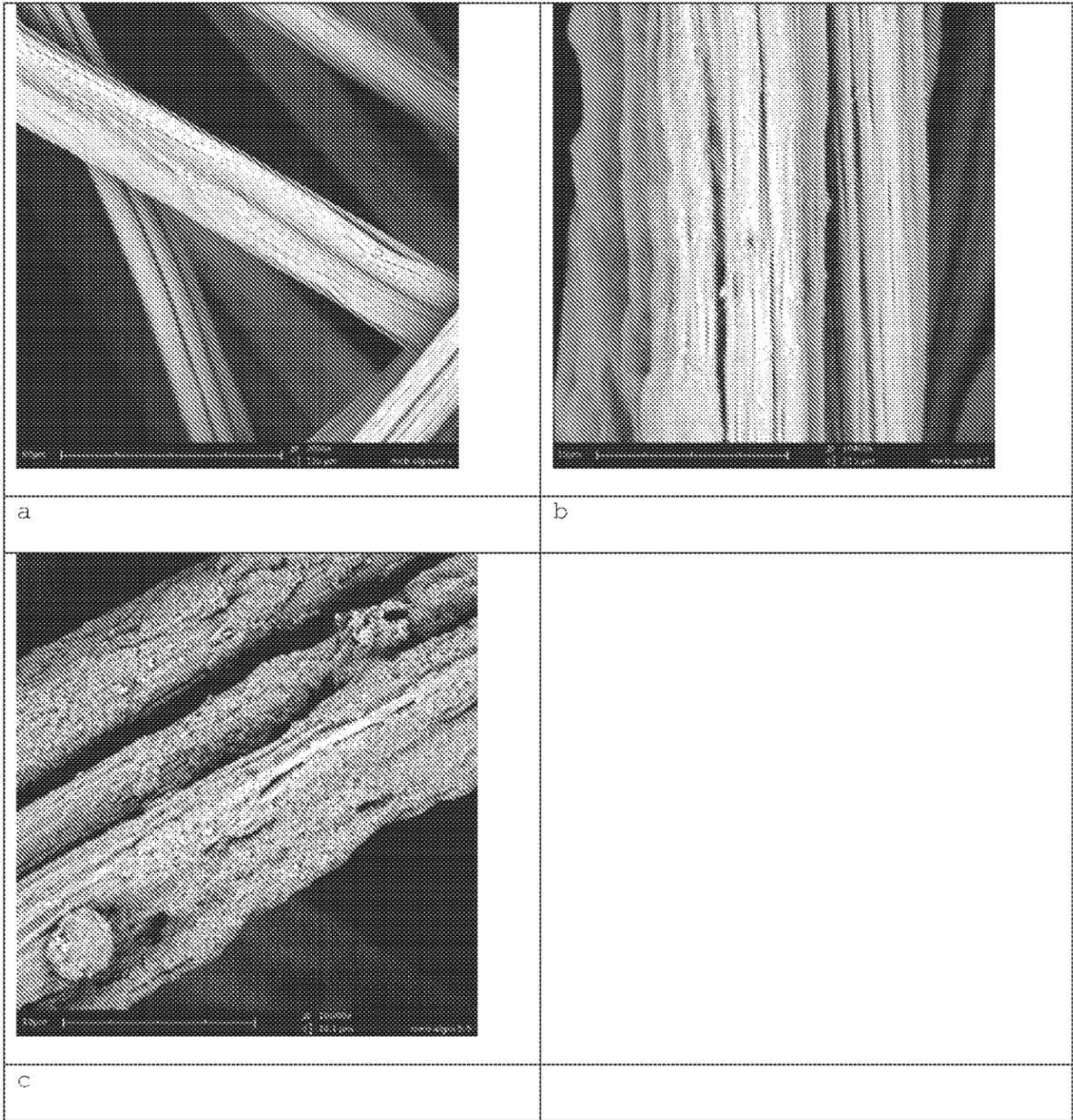


FIG. 5

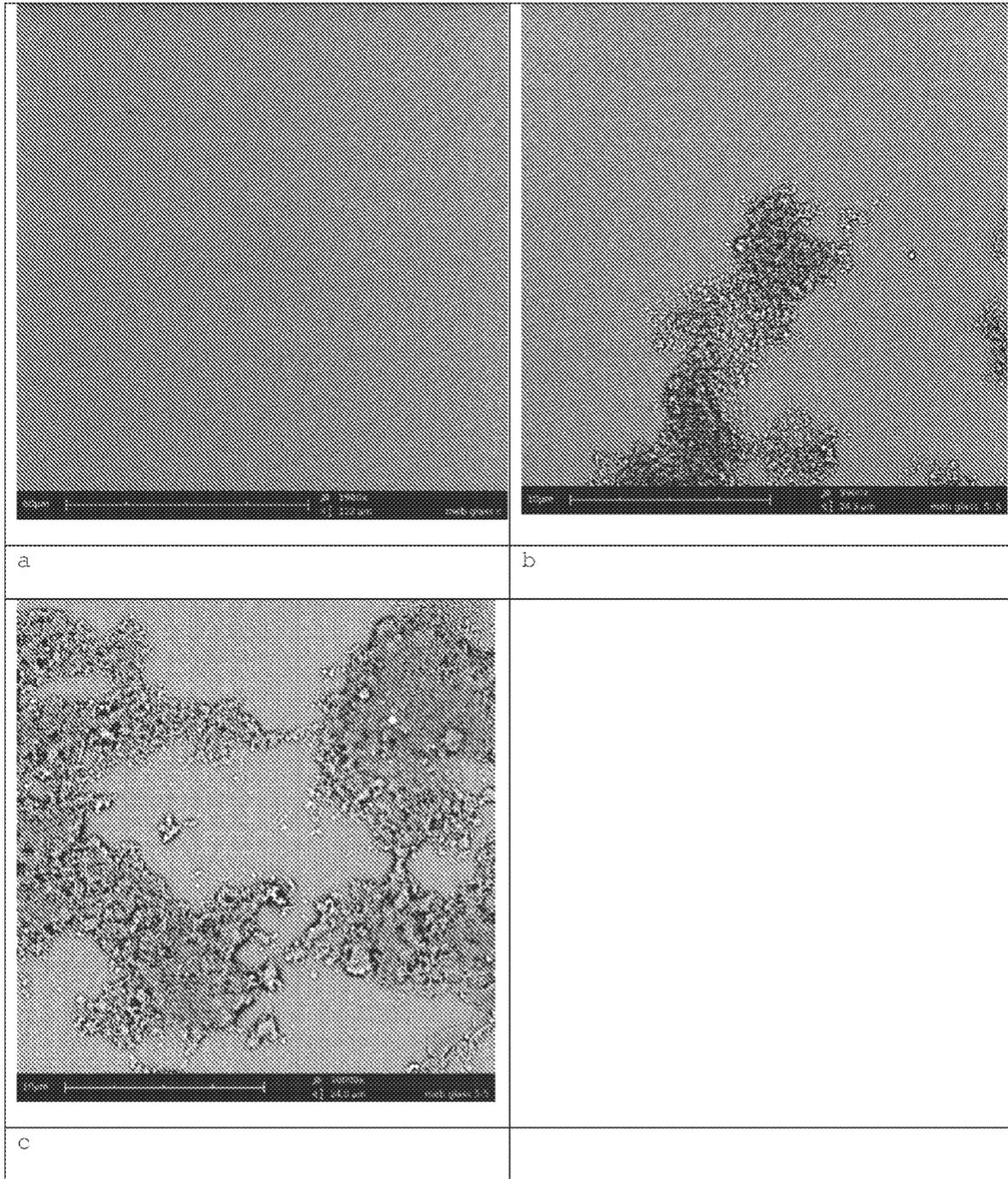


FIG. 6

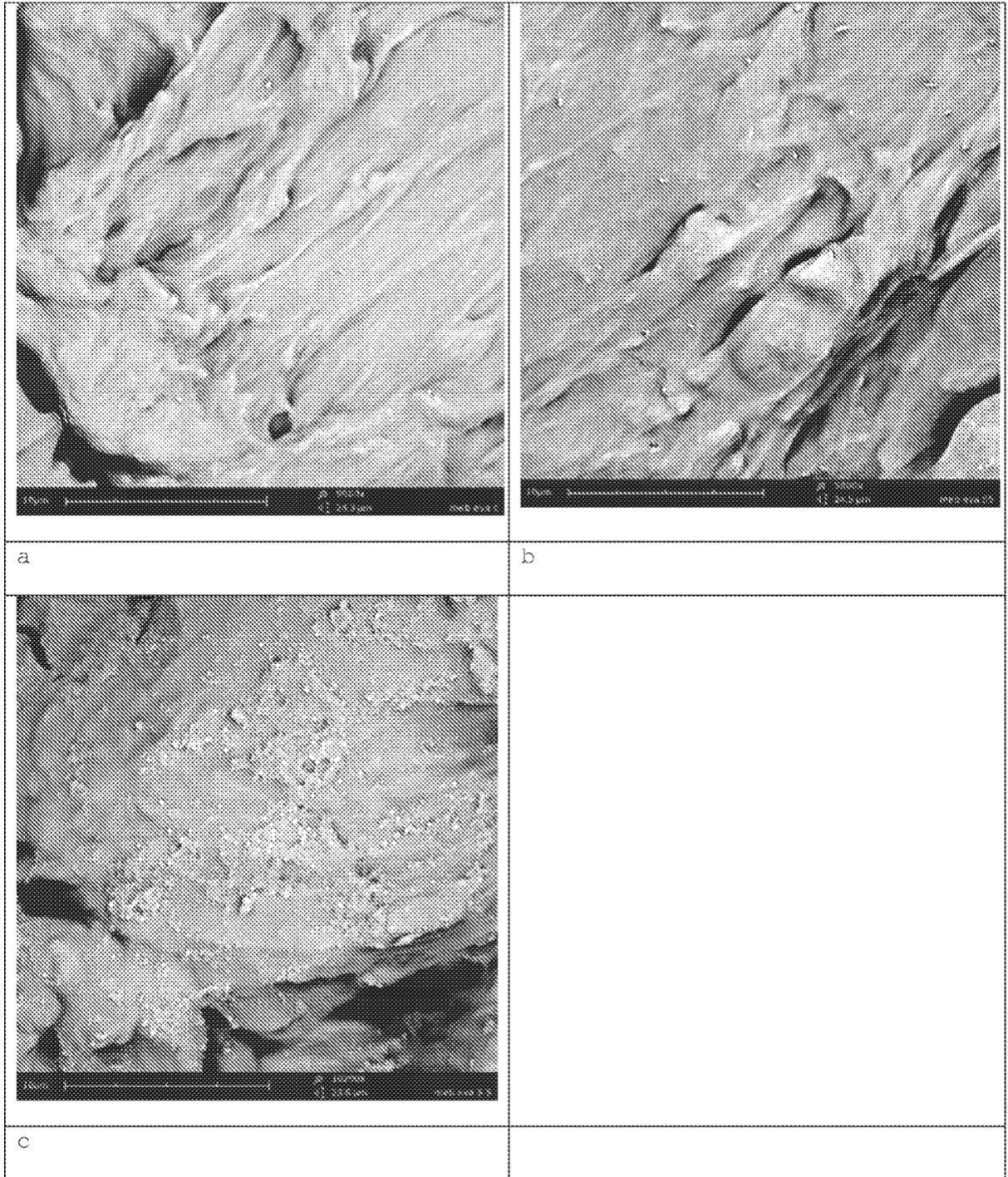


FIG. 7

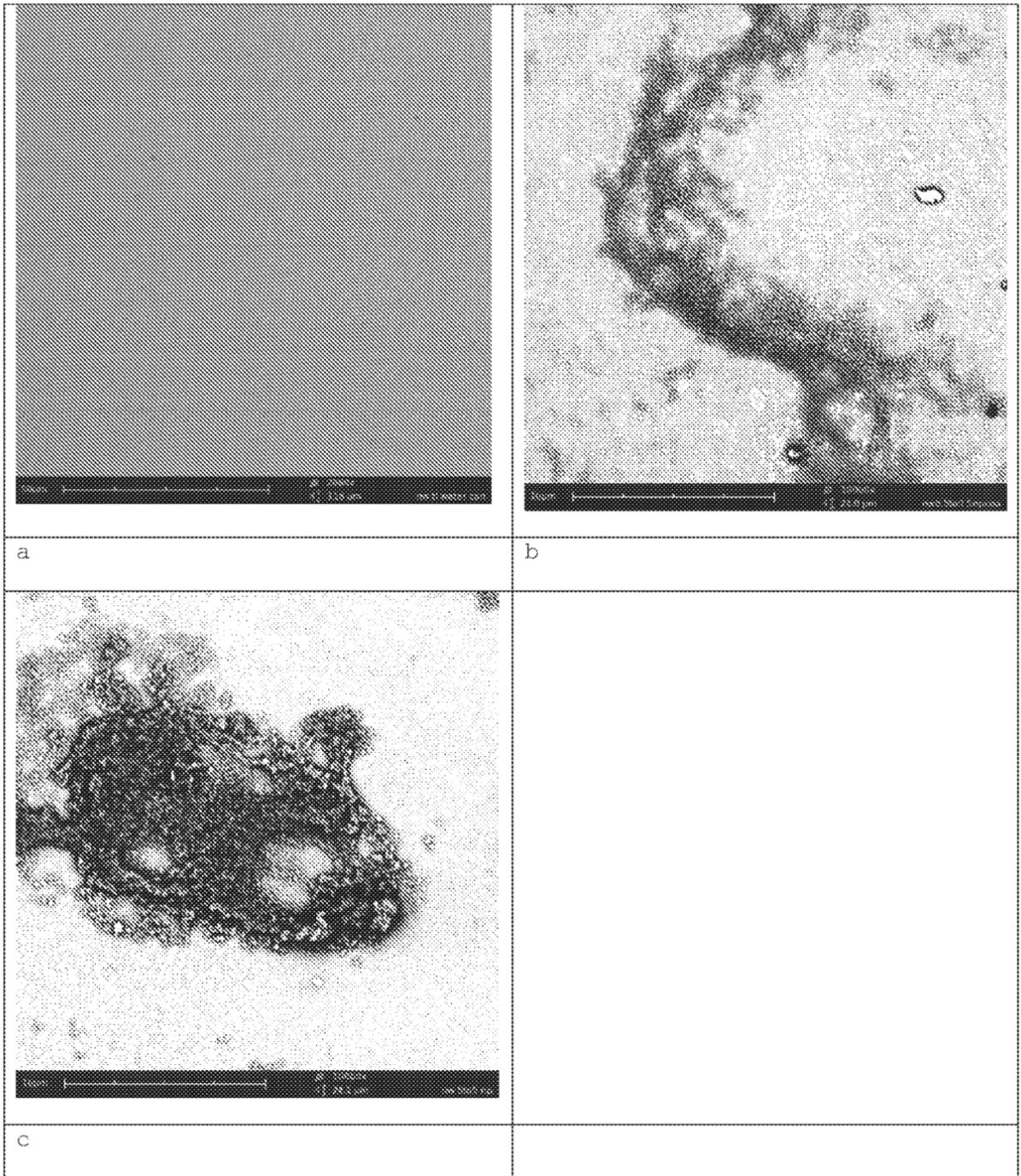


FIG. 8

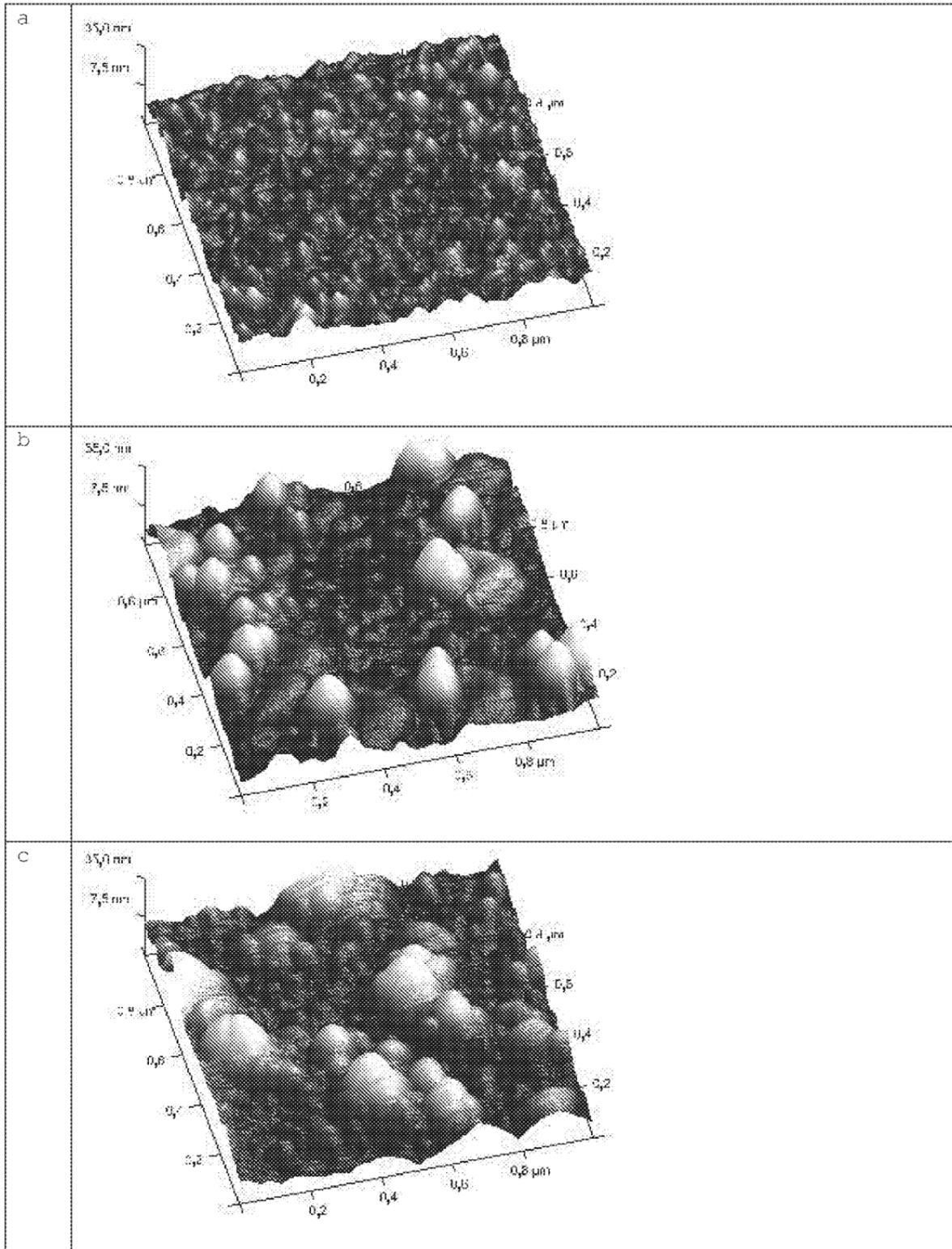


FIG. 9

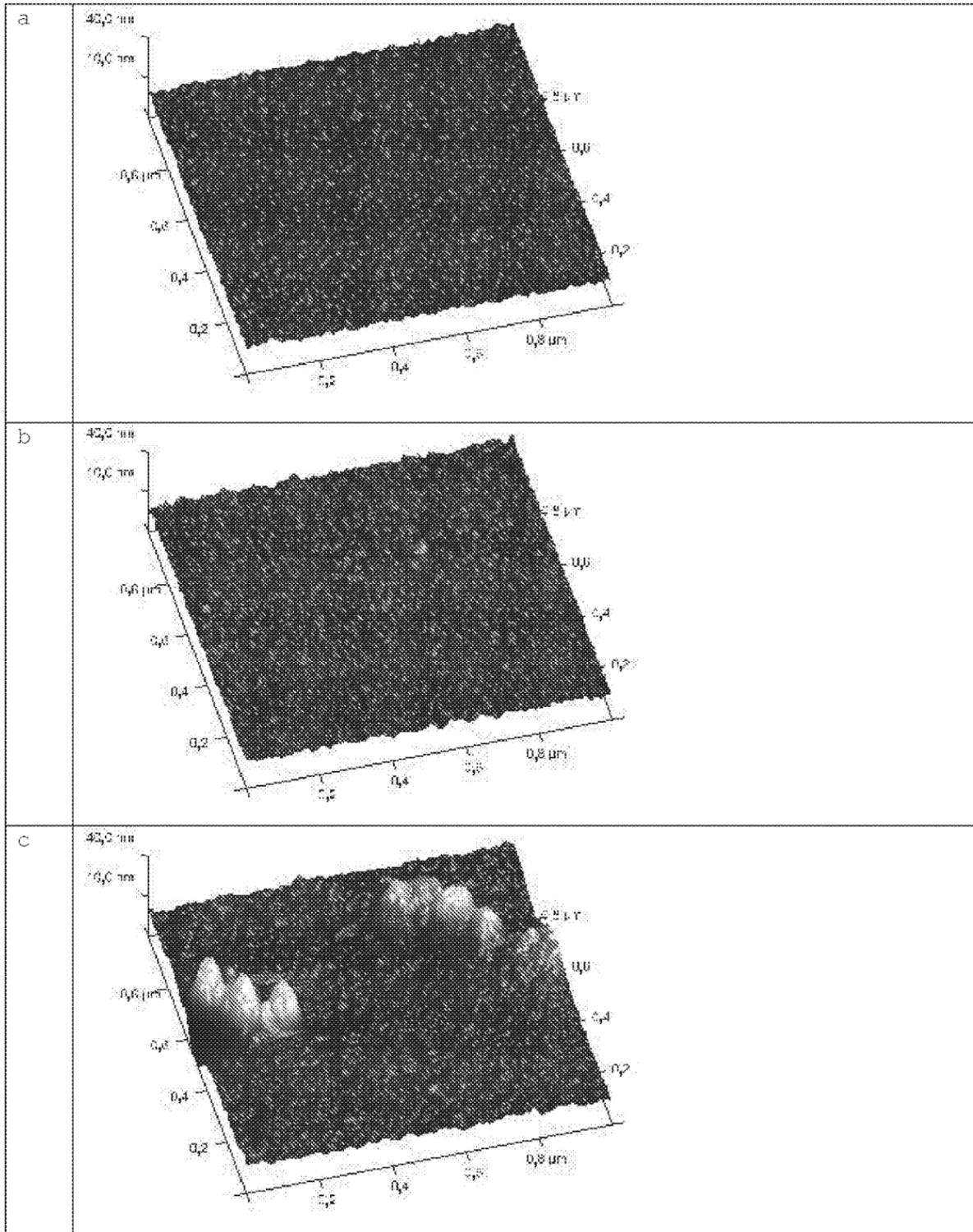


FIG. 10

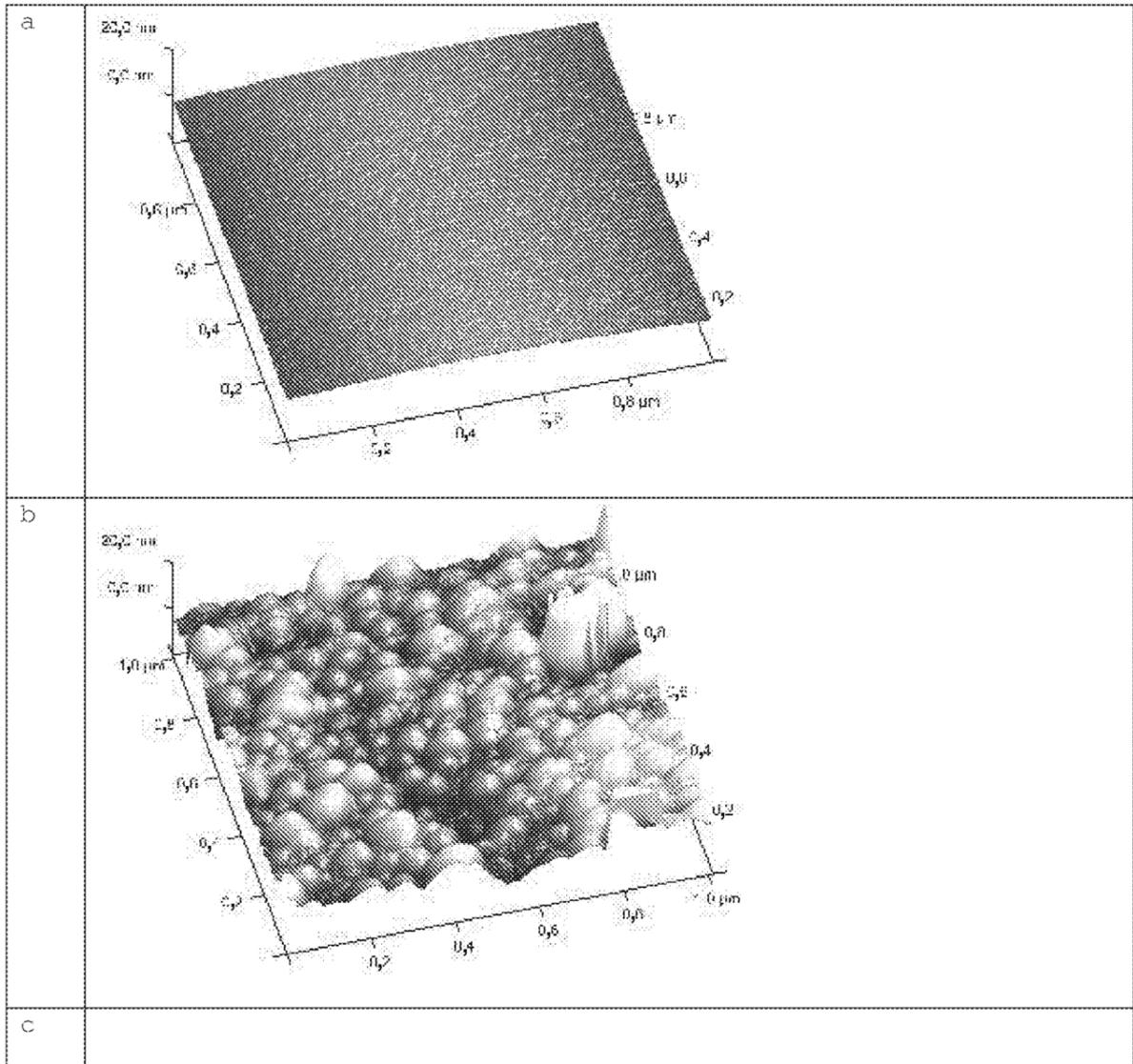


FIG. 11

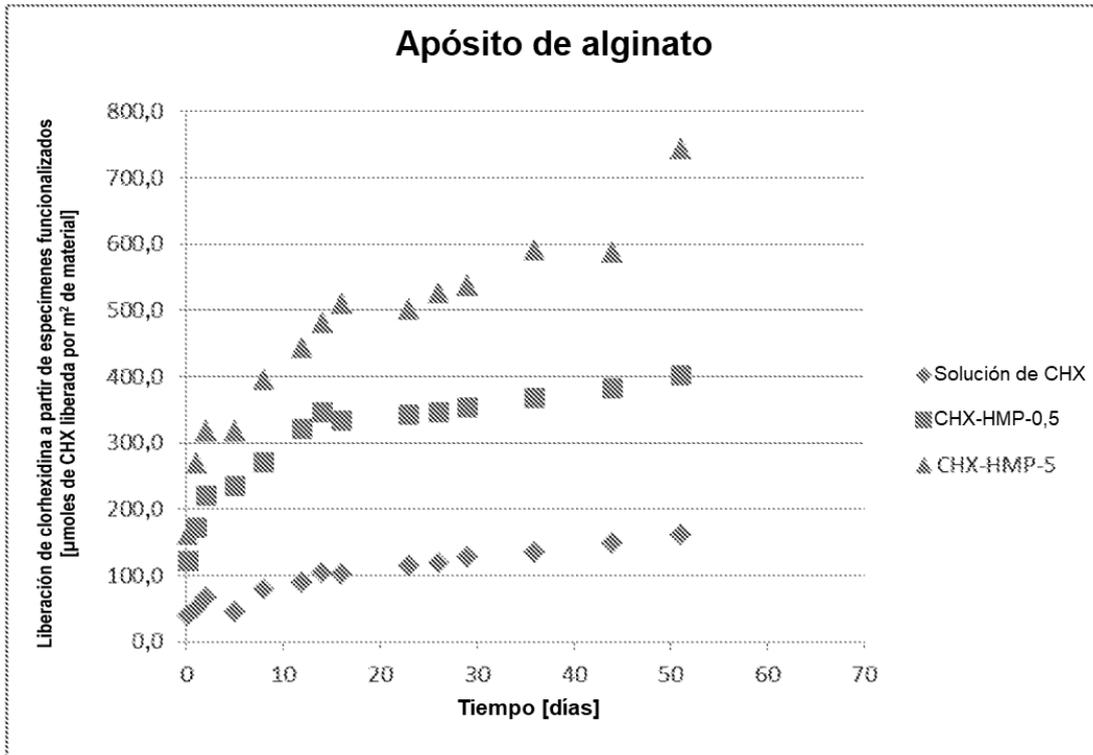


FIG. 12

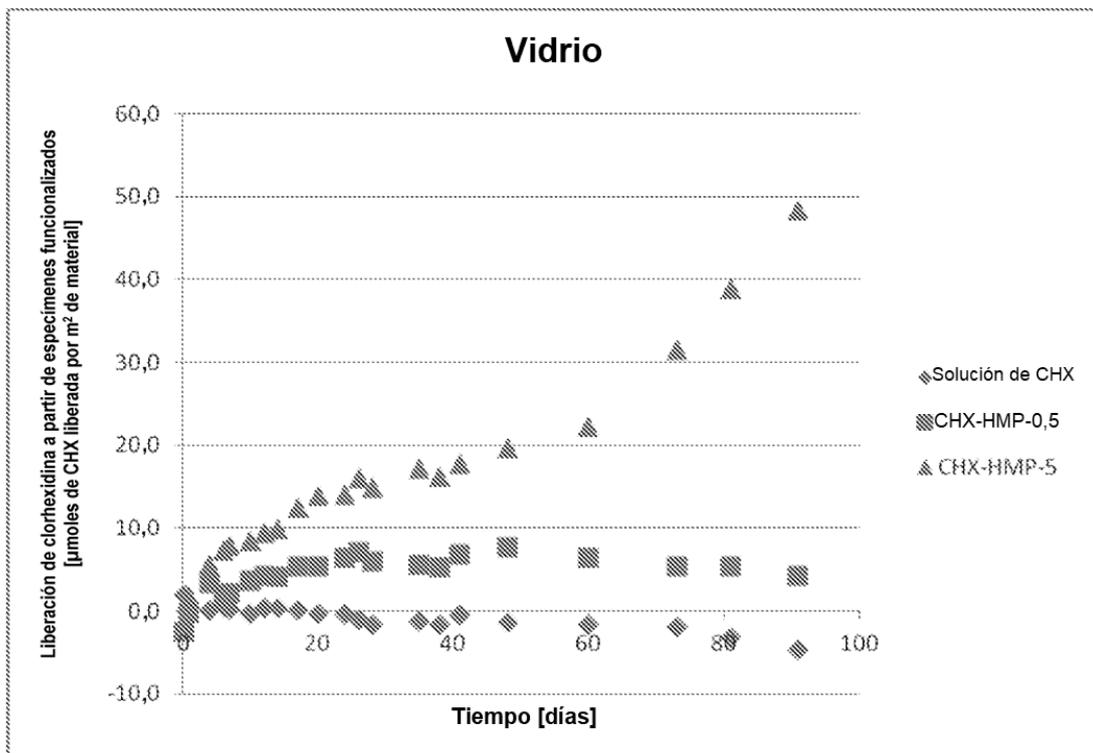


FIG. 13

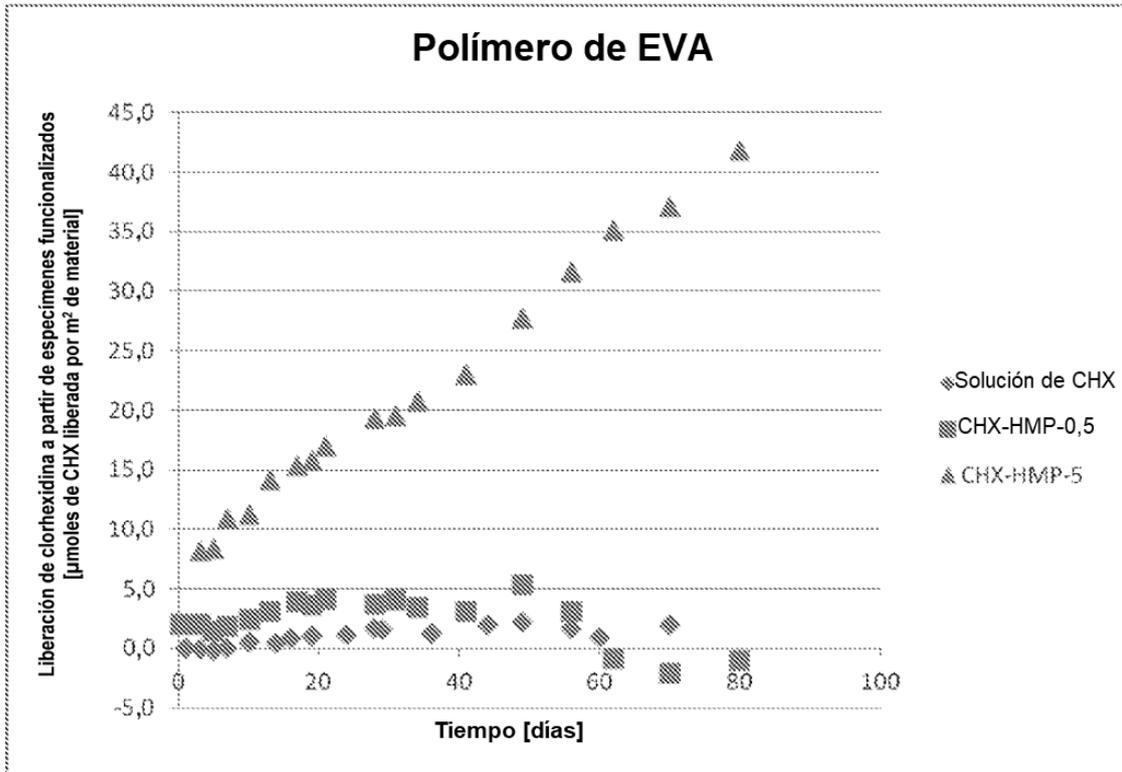


FIG. 14

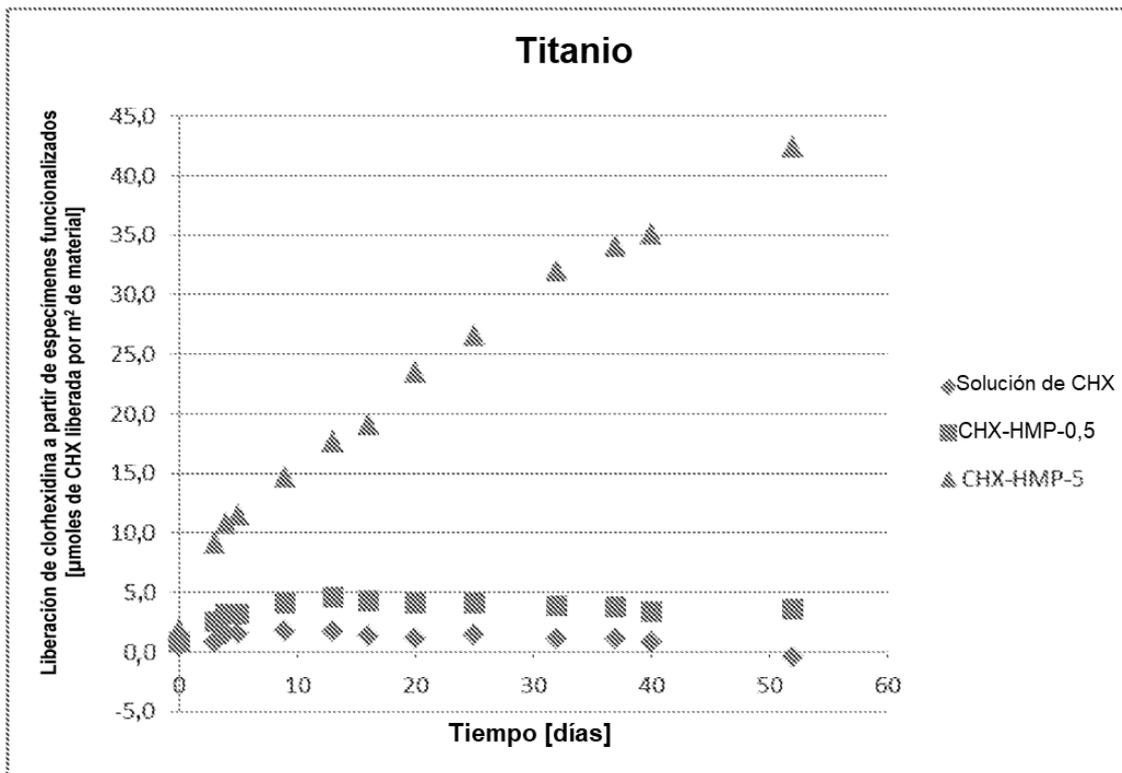


FIG. 15

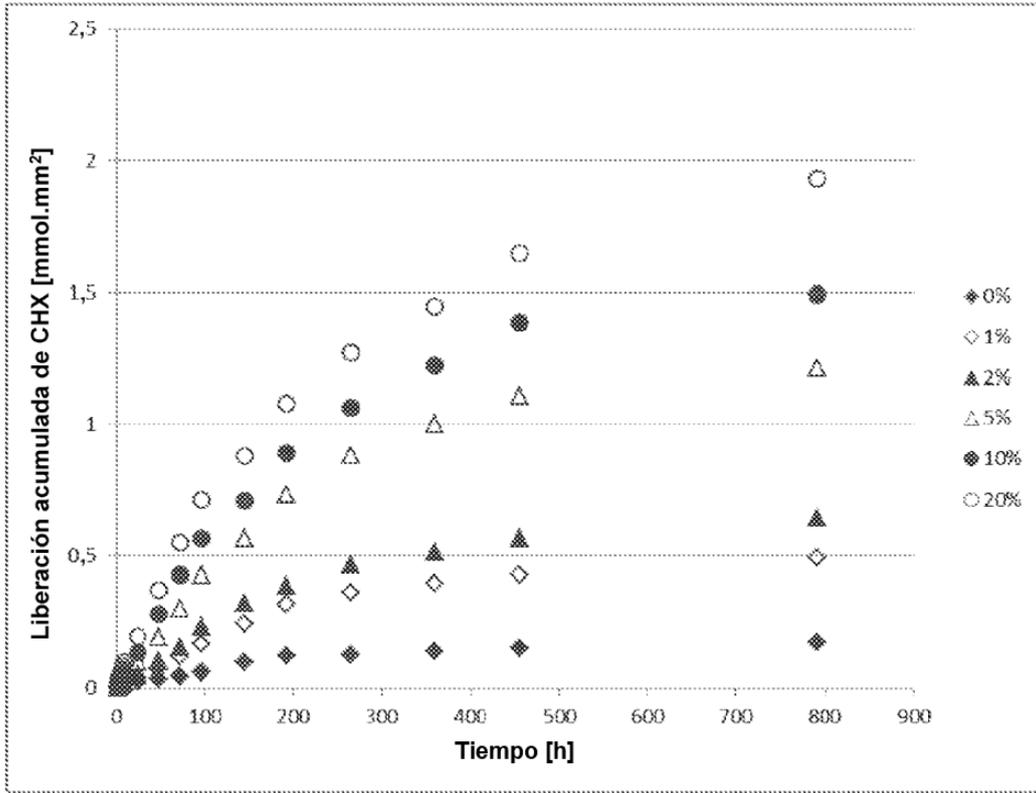


FIG. 16

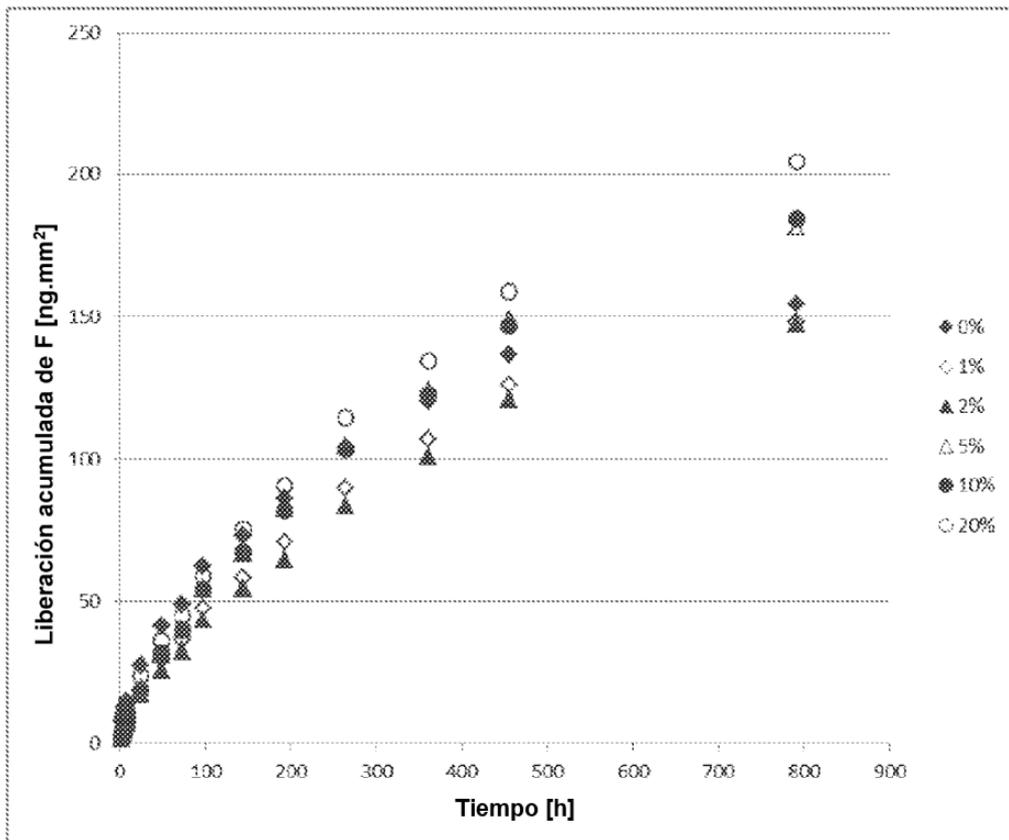


FIG. 17

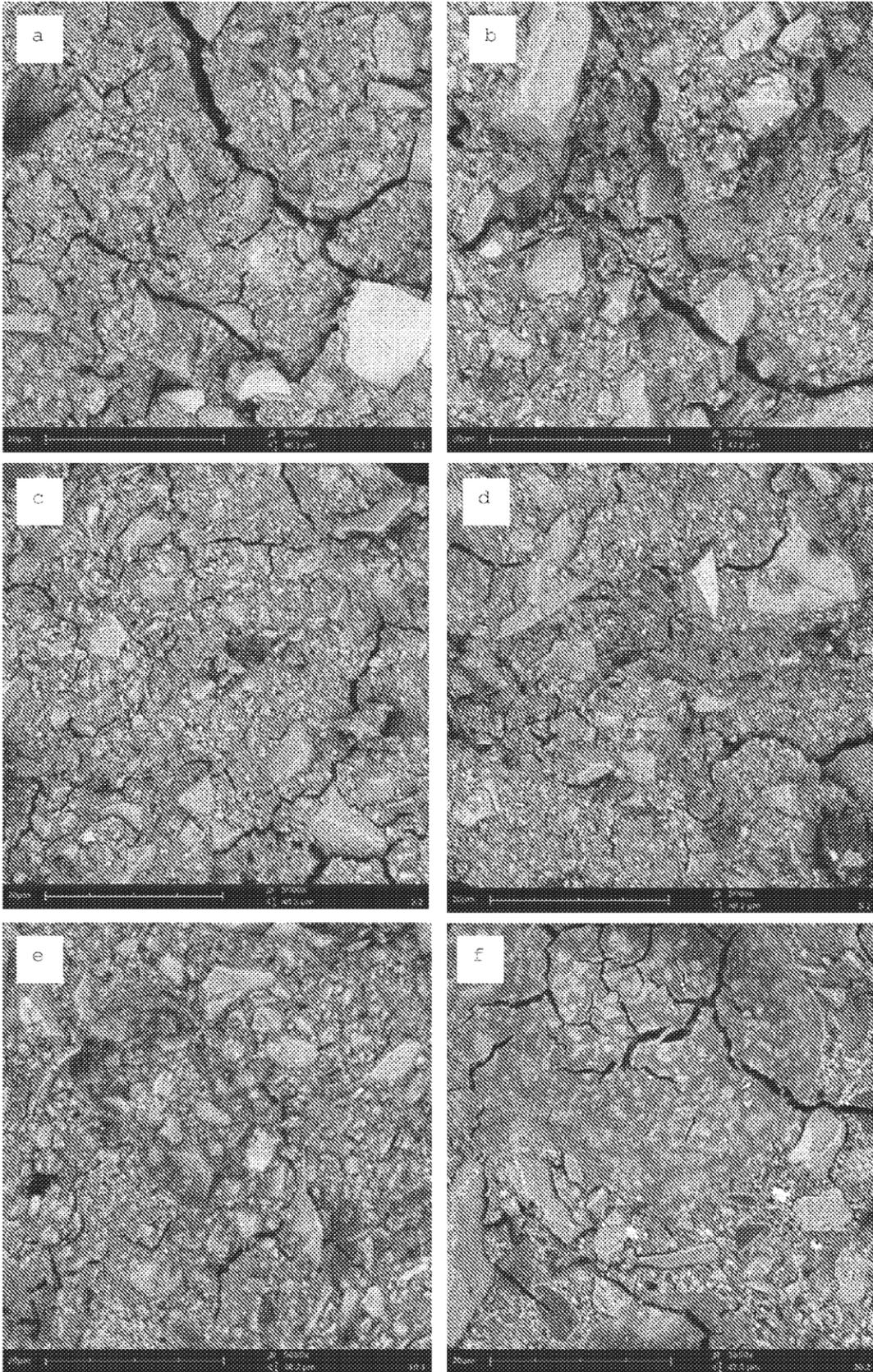


FIG. 18

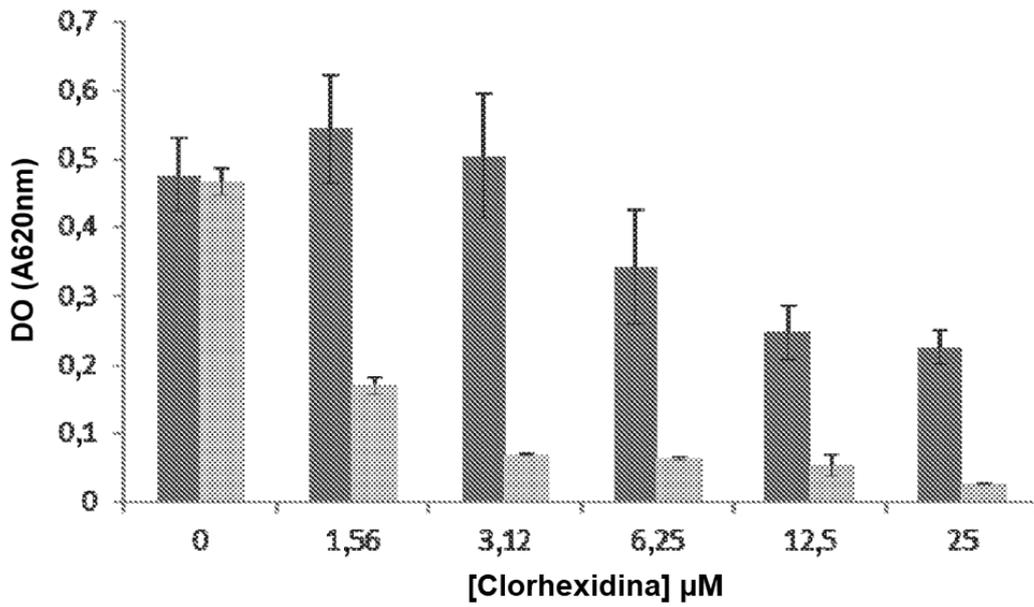


FIG. 19

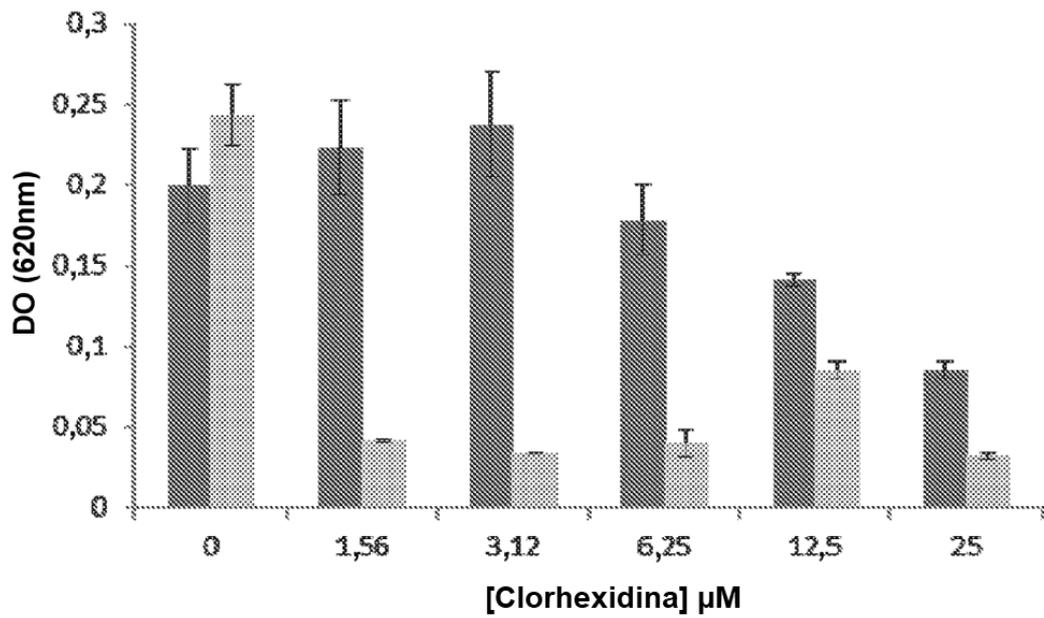


FIG. 20

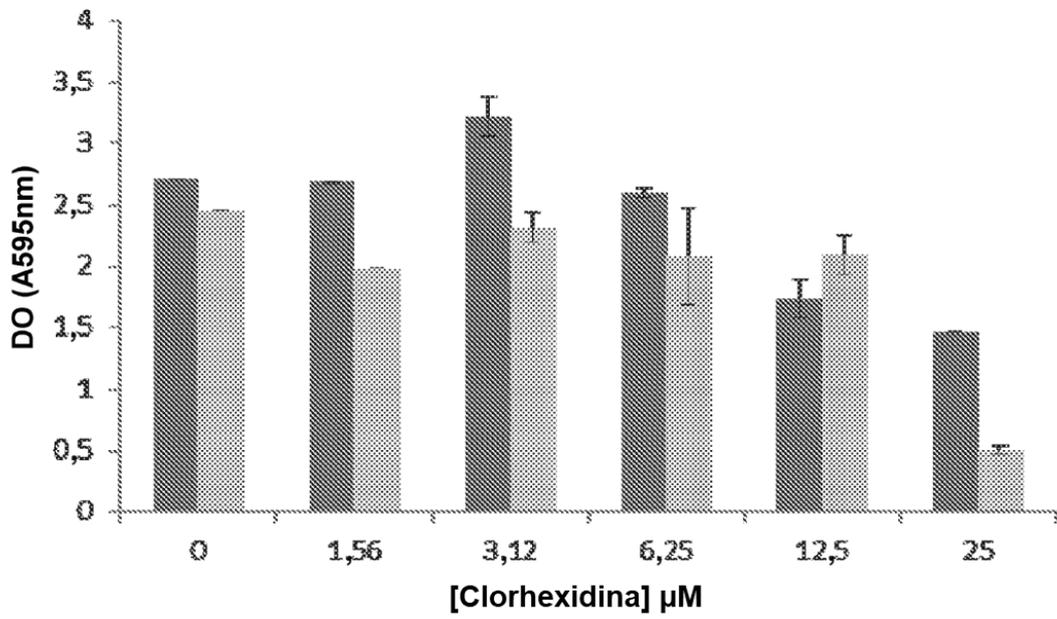


FIG. 21

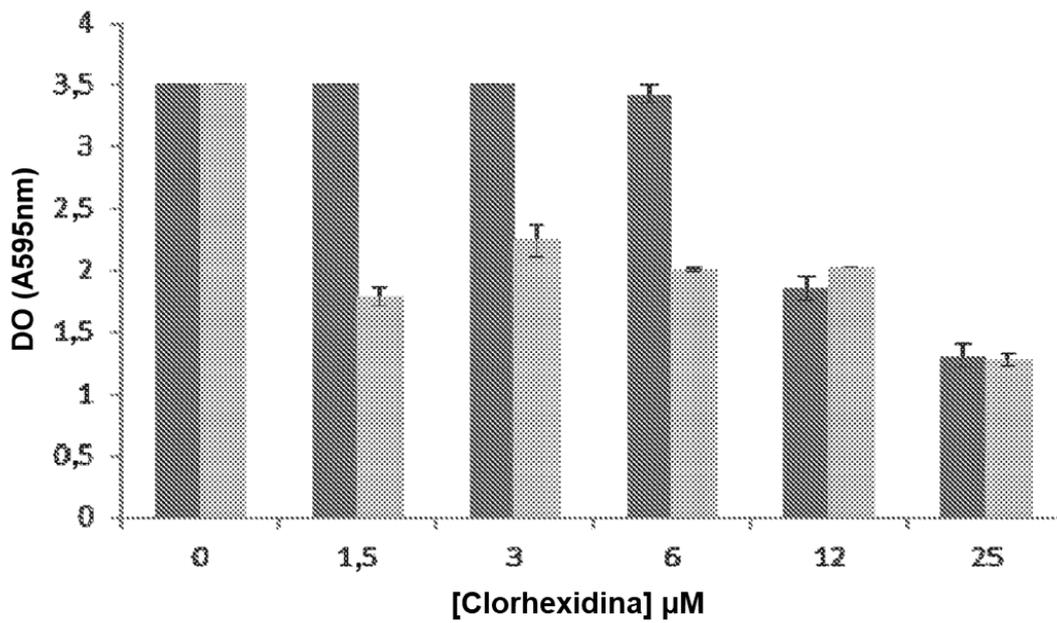


FIG. 22

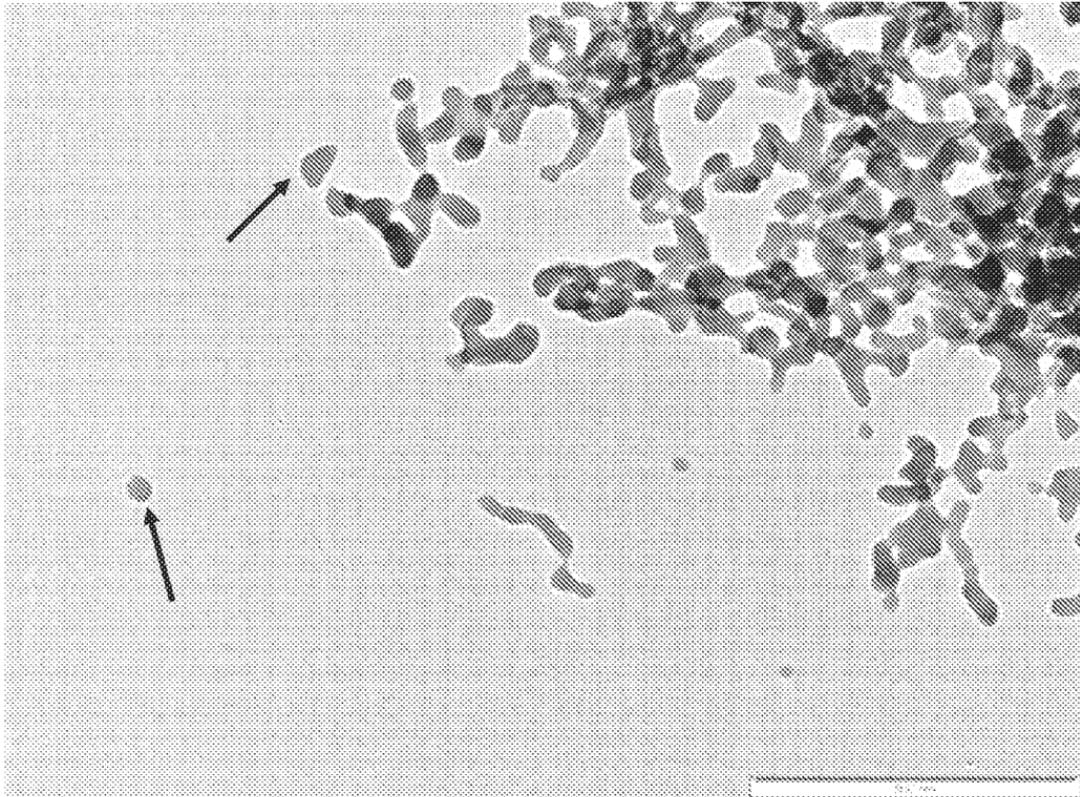
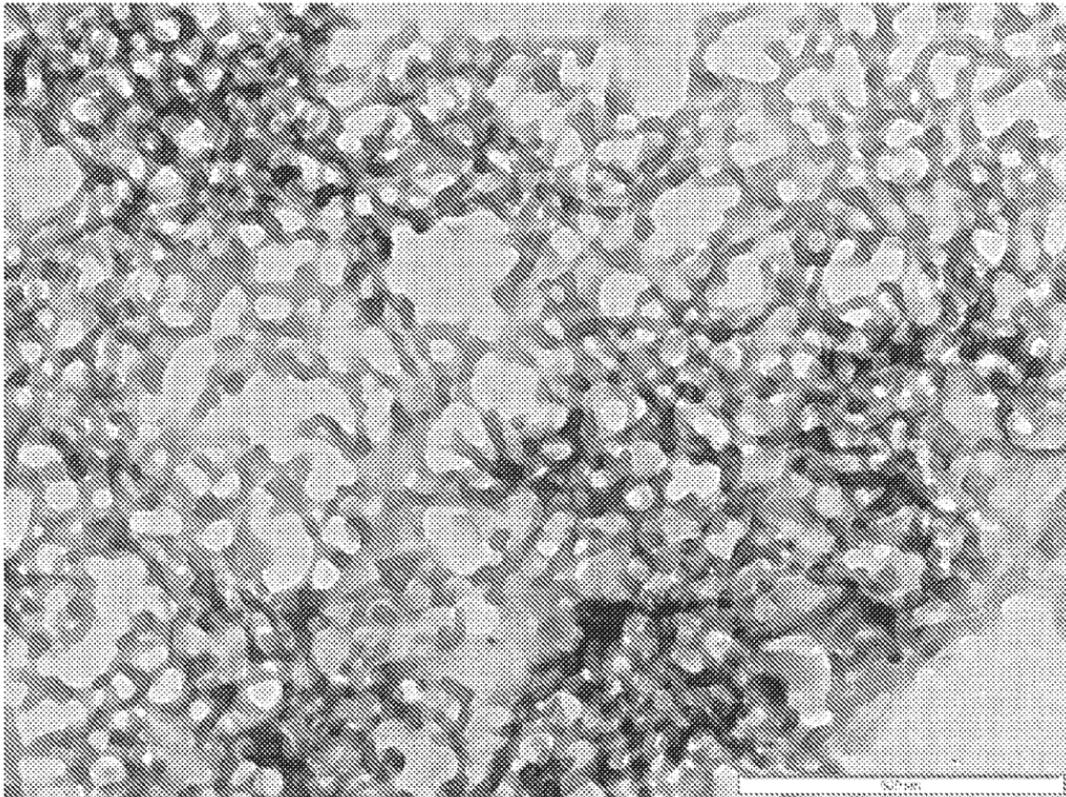


FIG. 23

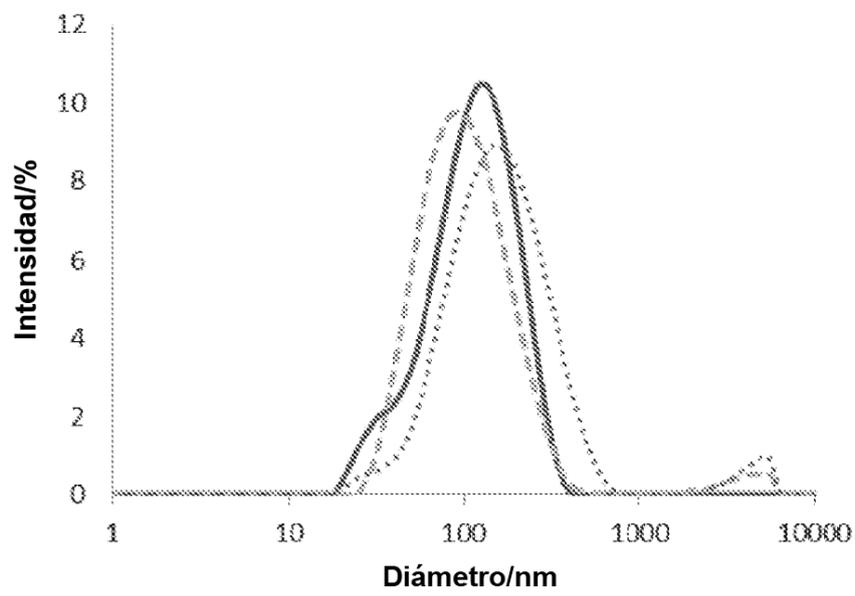
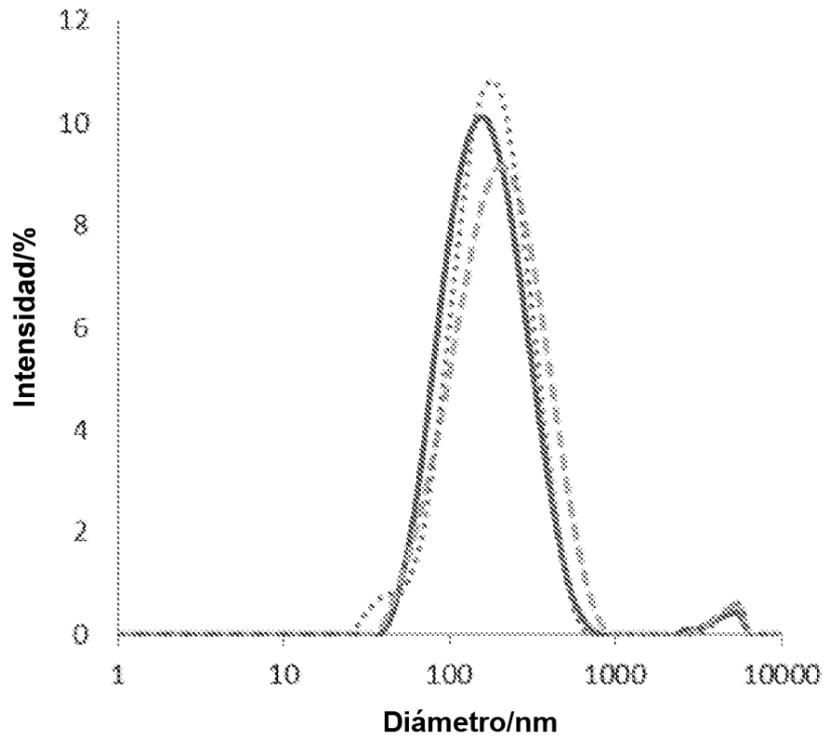


FIG. 24

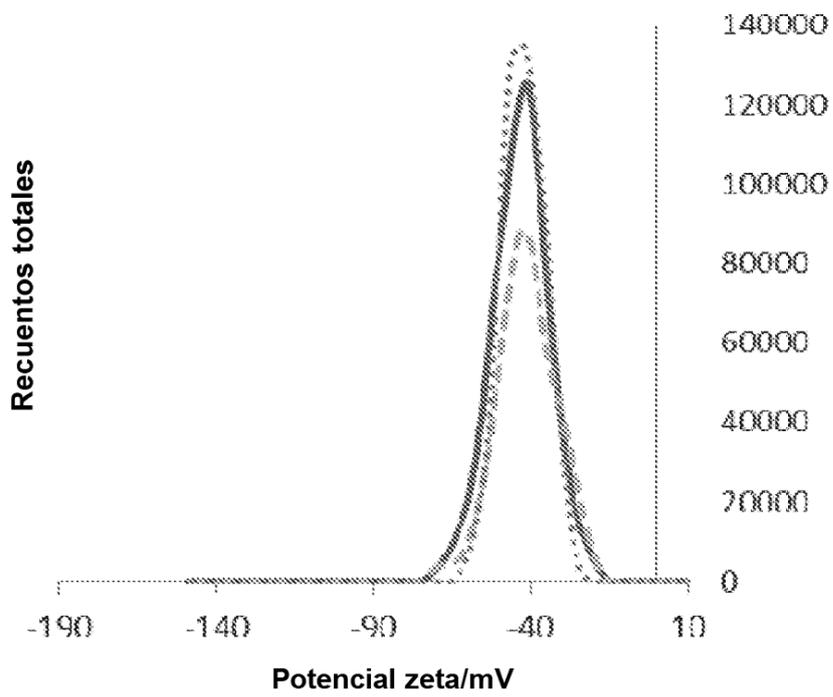
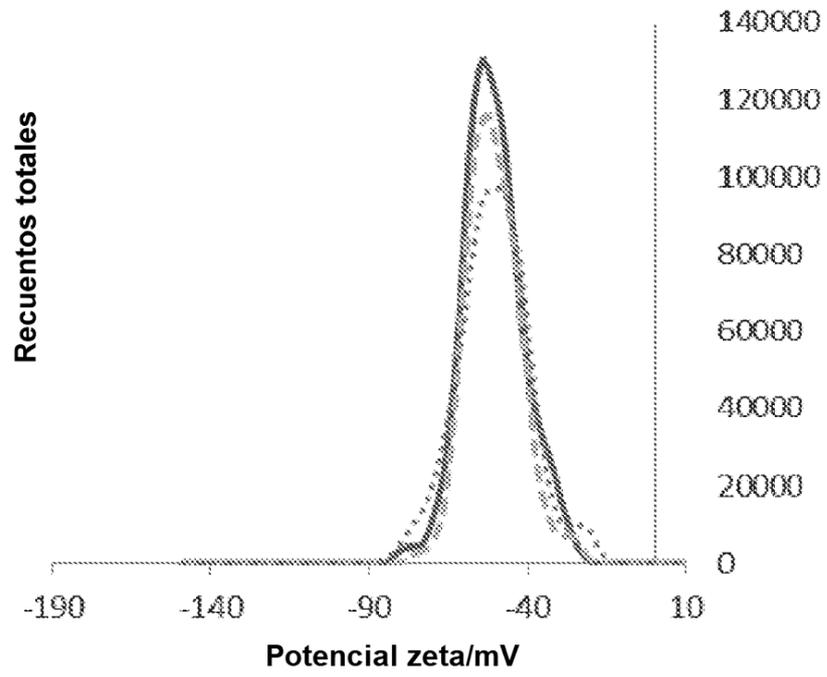


FIG. 25

Elución de CHX a partir de películas de CMC (55 g de CMC por m²)

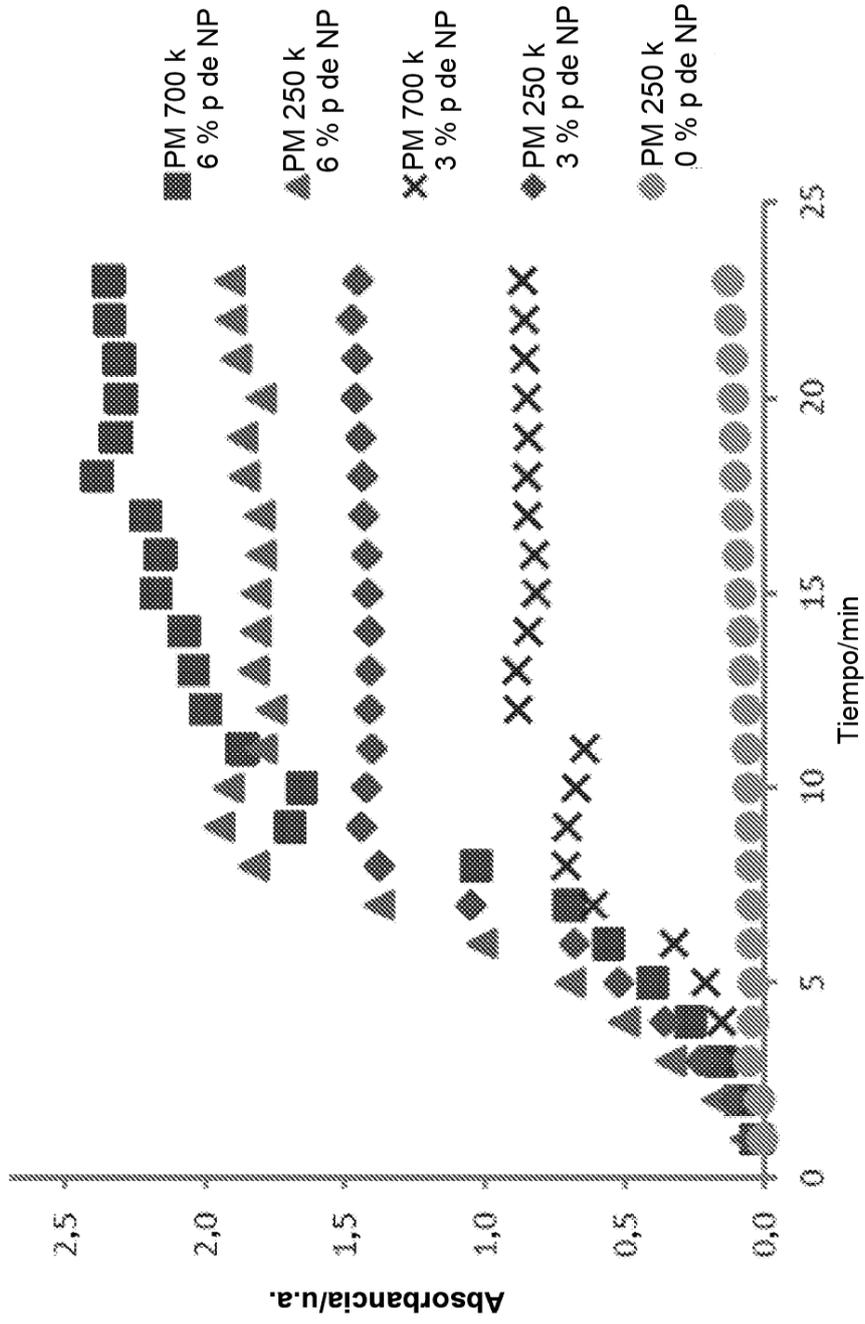


FIG. 26

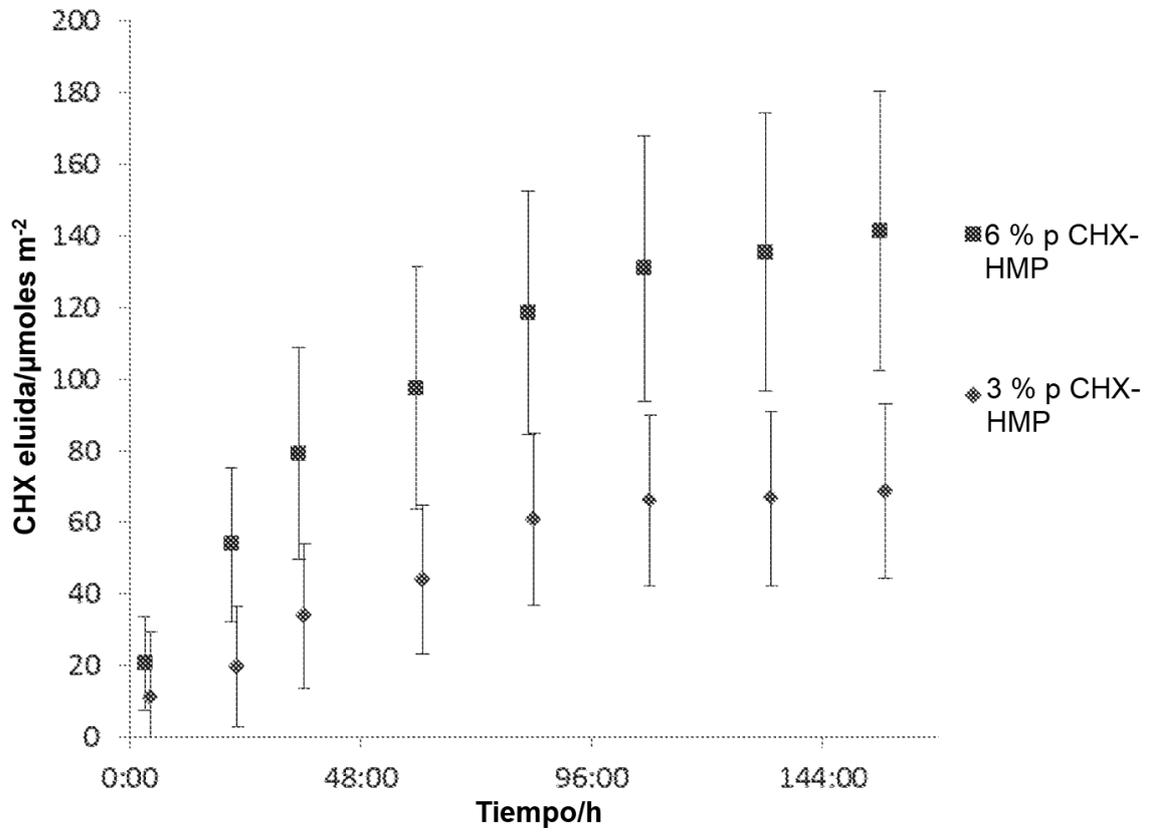


FIG. 27

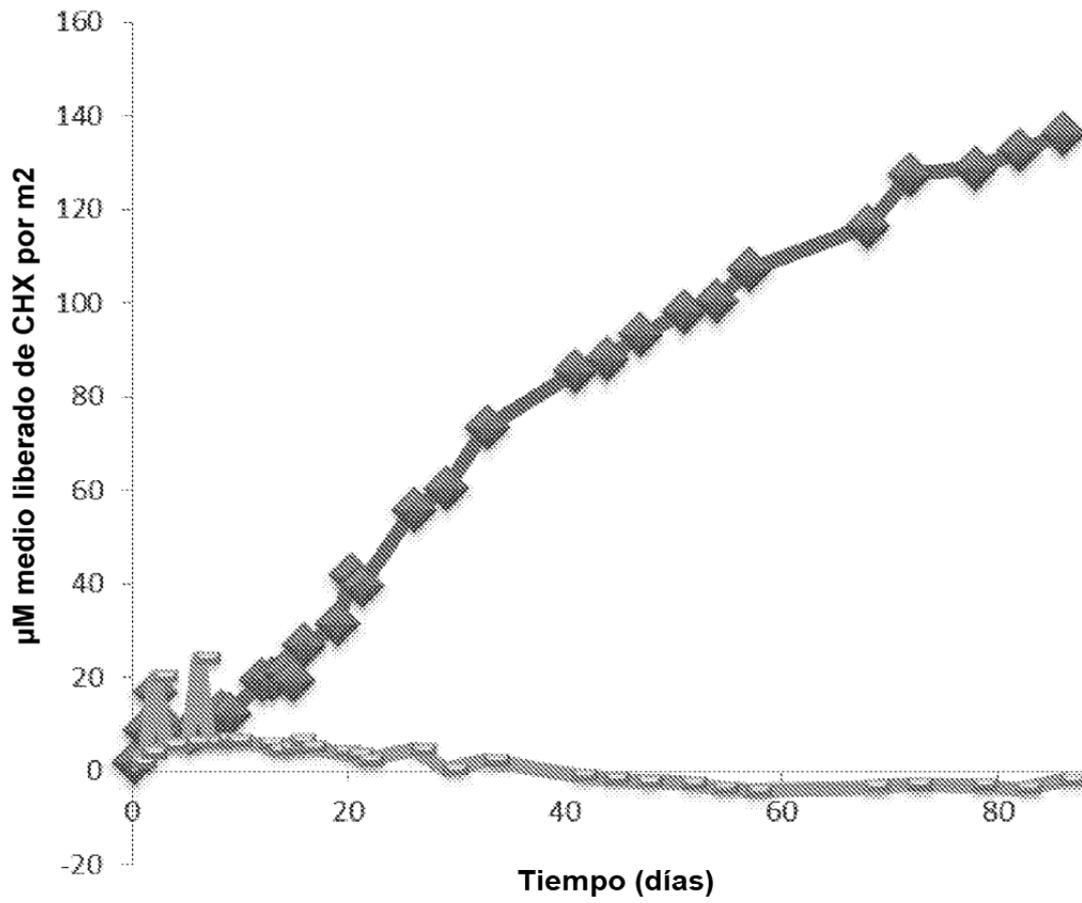


FIG. 28

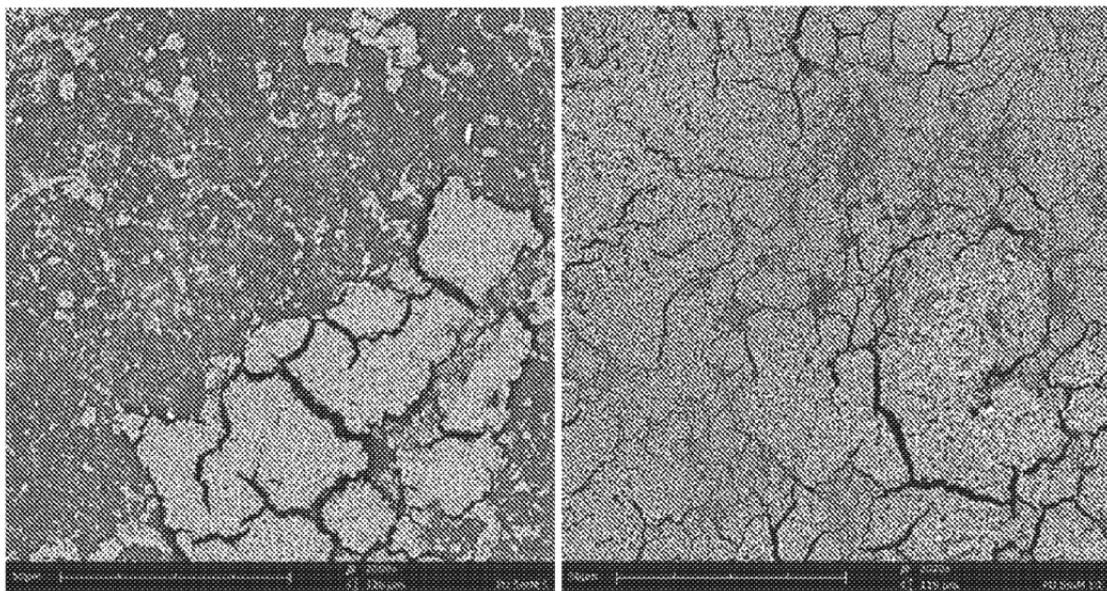


FIG. 29

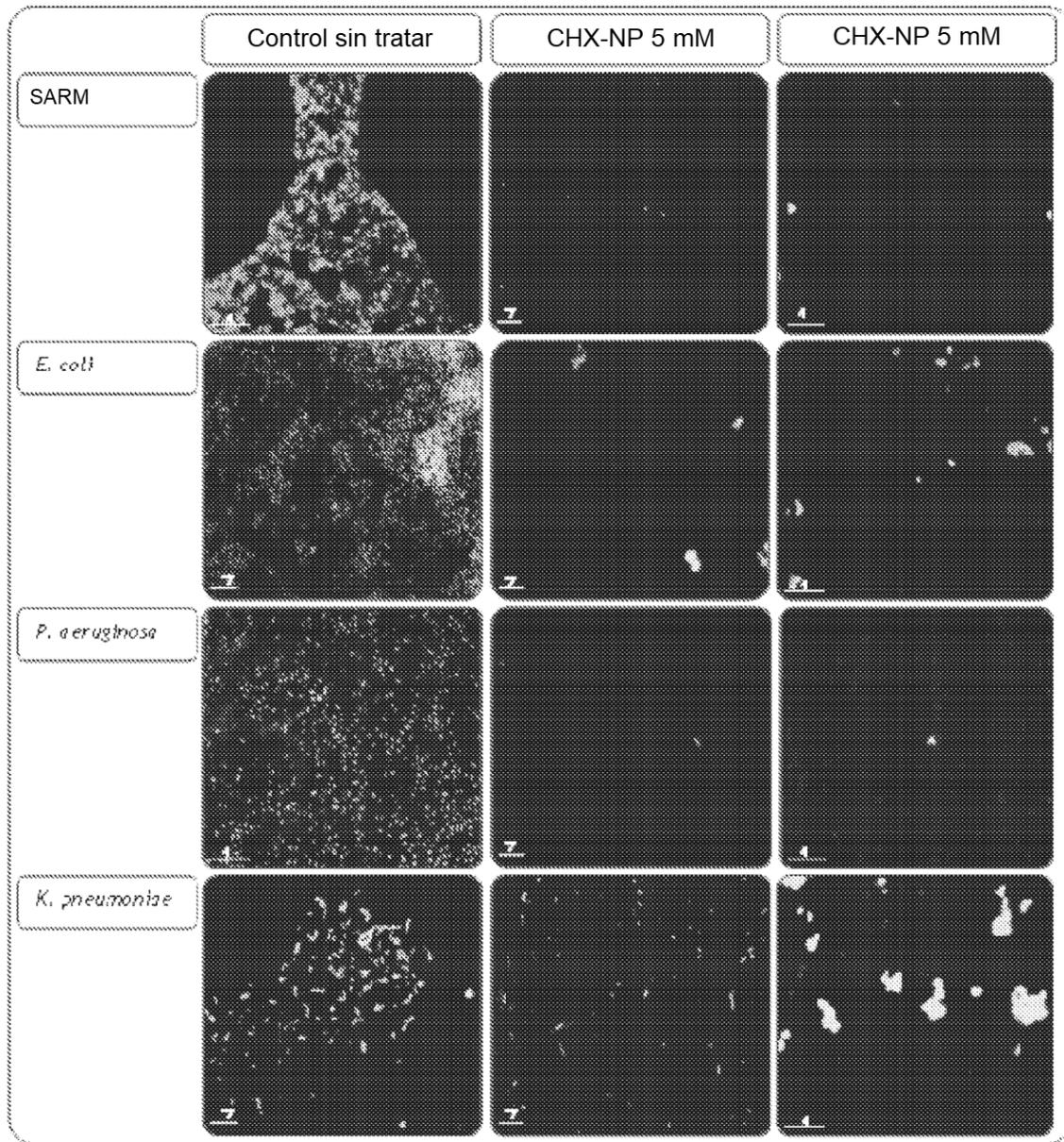


FIG. 30

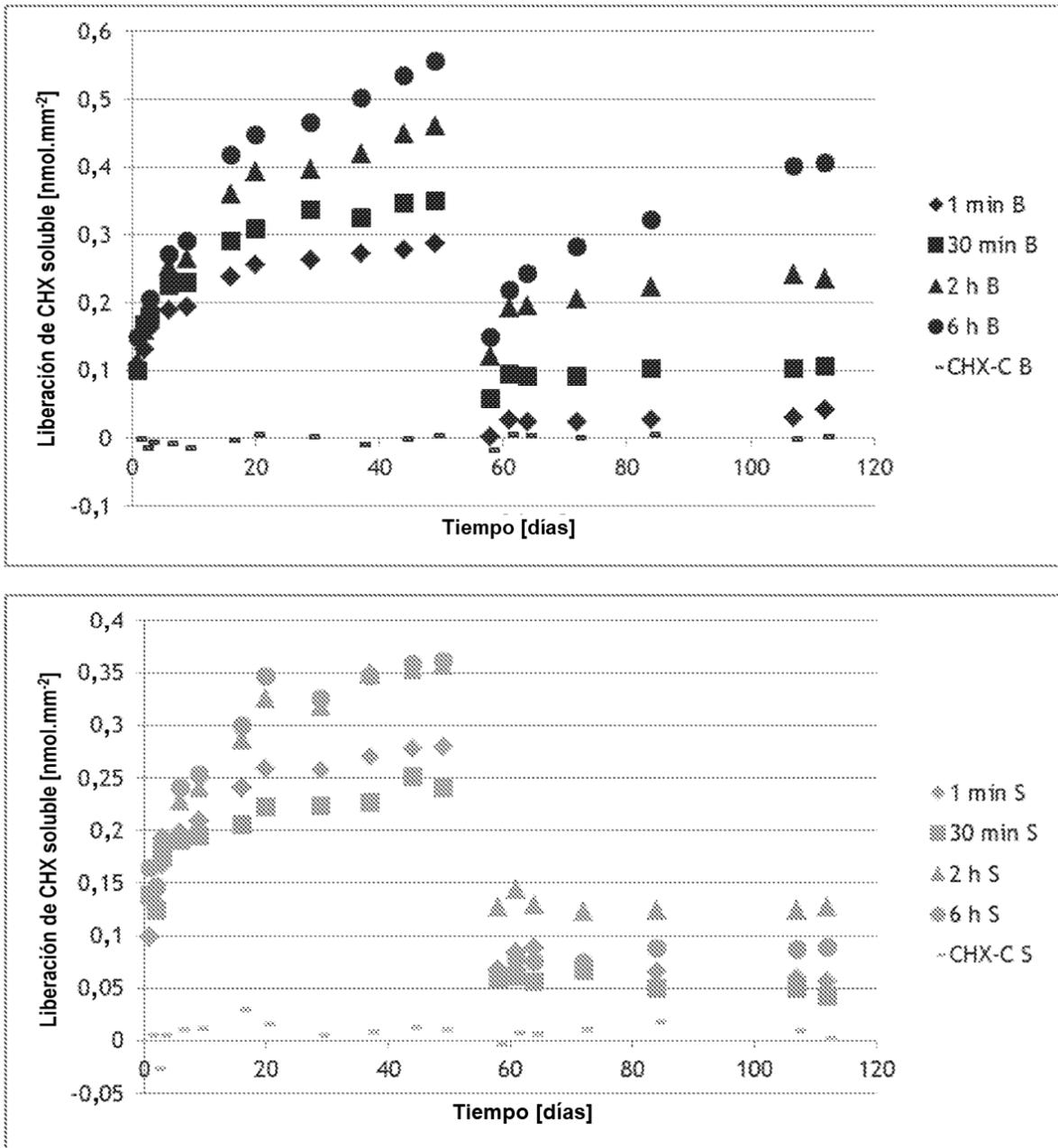


FIG. 31

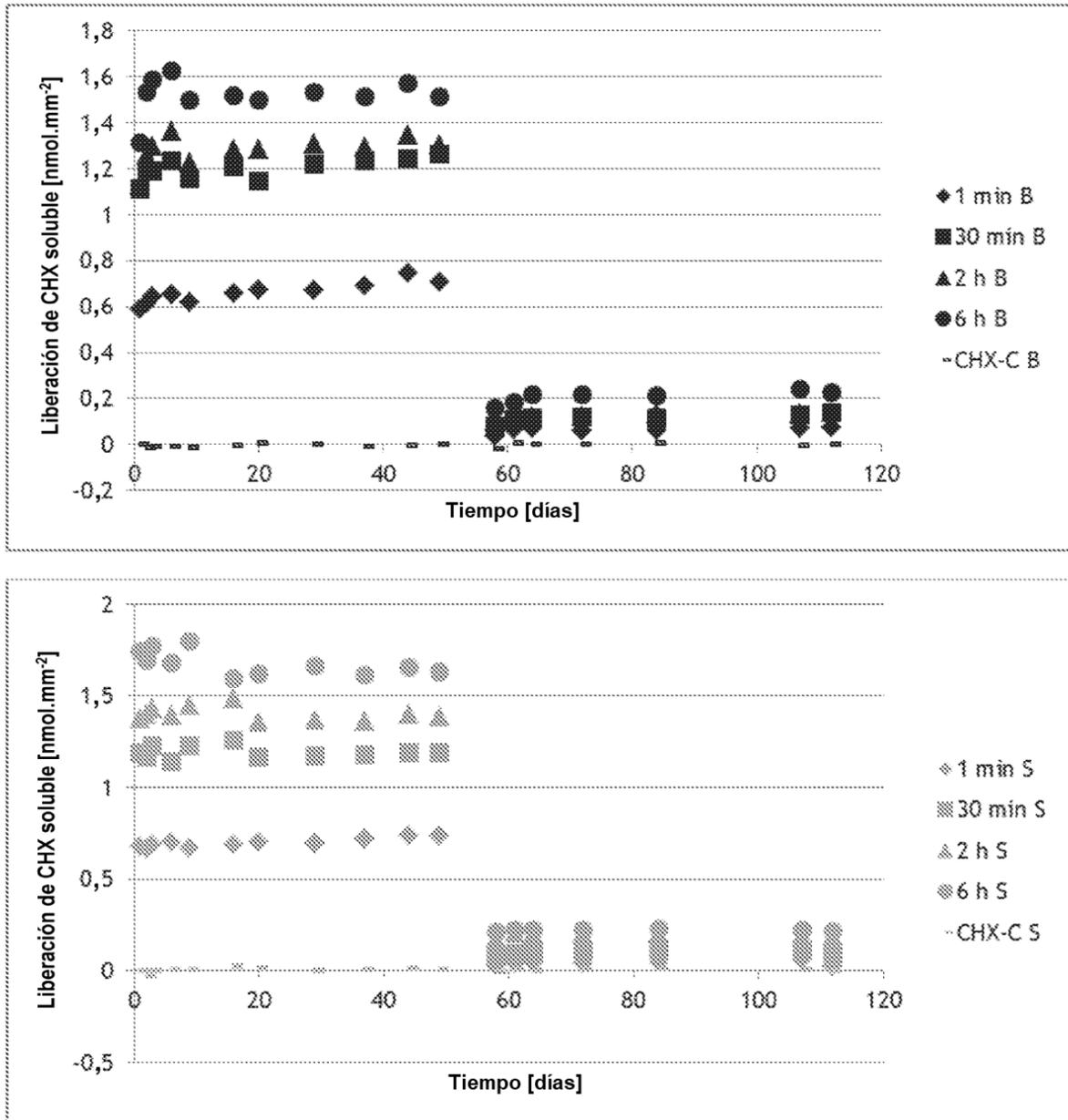


FIG. 32

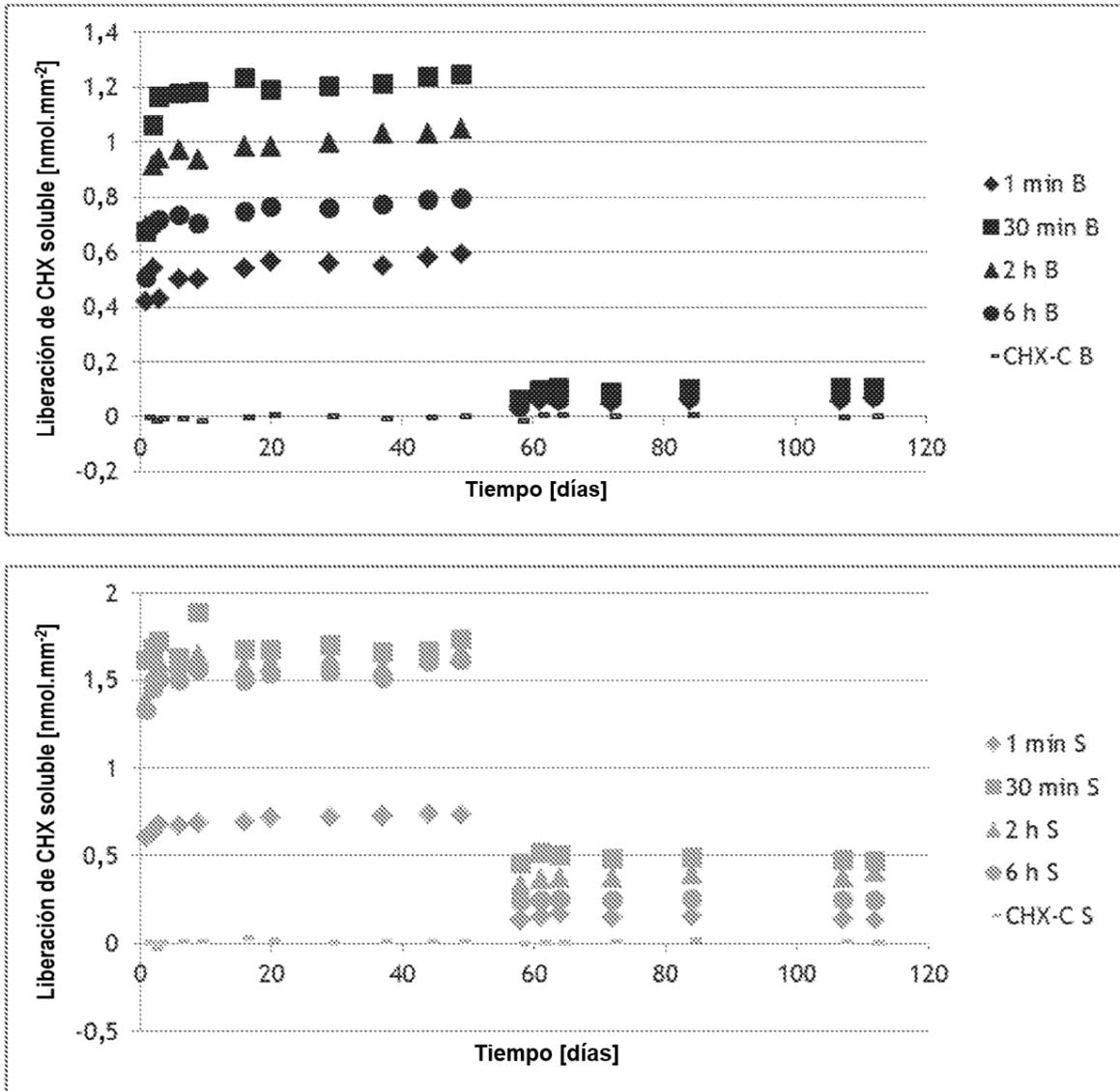


FIG. 33

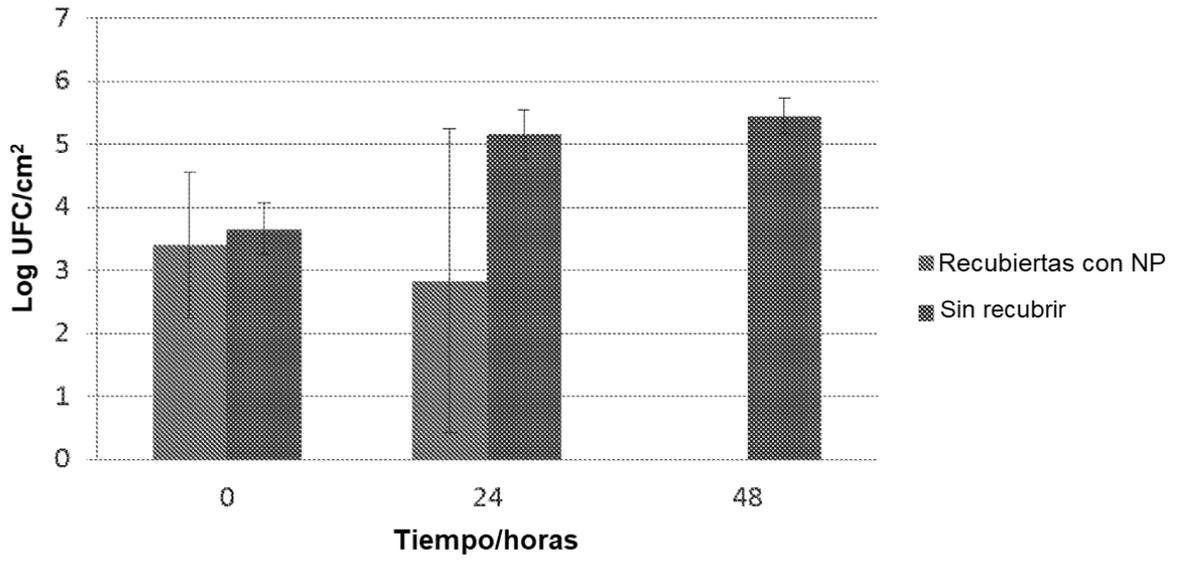


FIG. 34

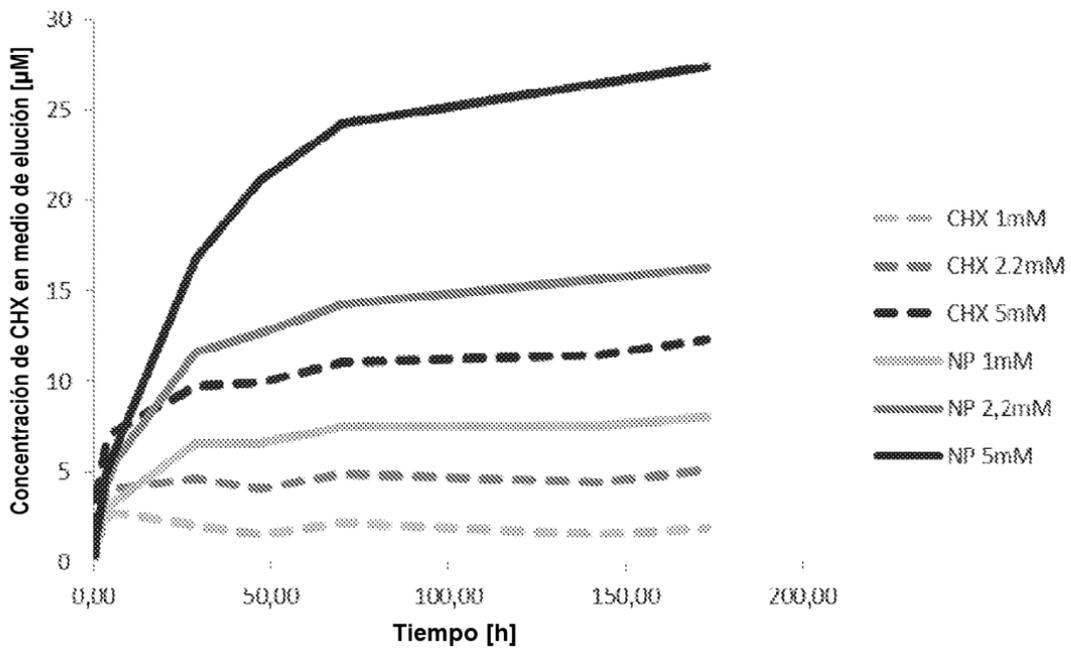


FIG. 35

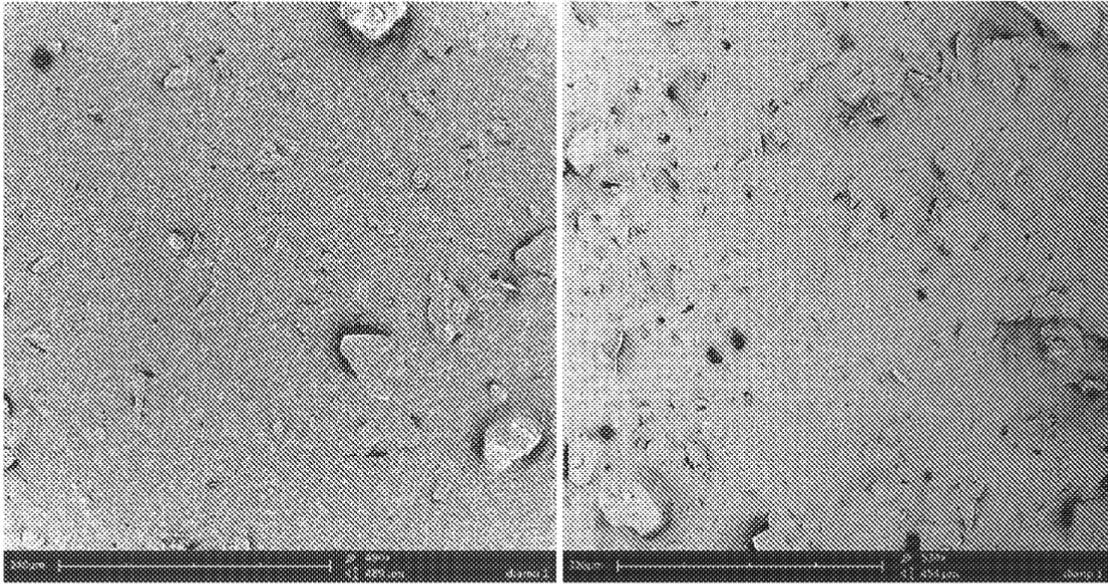


FIG. 36

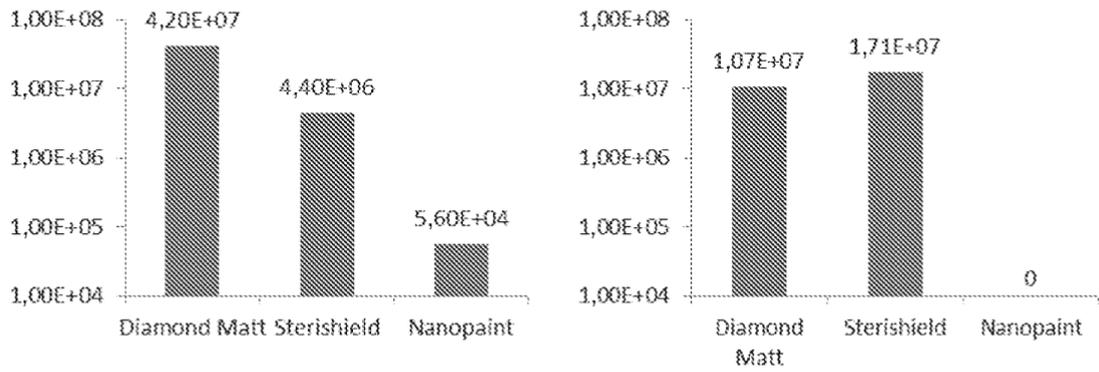


FIG. 37