

DESARROLLO DE UN PRODUCTO ANTIMICROBIANO CON BASE EN PROPÓLEOS PARA USO ODONTOLÓGICO EN ENDODONCIA. PROP-AAA

CAMPO TÉCNICO

5

El presente desarrollo está relacionado con el campo de la industria farmacéutica, particularmente con composiciones antimicrobianas para uso odontológico, y más particularmente con composiciones antimicrobianas a base de propóleo para uso odontológico en endodoncia.

10

ANTECEDENTES

15

Uno de los principales problemas asociados al tratamiento de conductos en endodoncia es la infección generada por microorganismos, particularmente bacterias, la cual genera inflamación periapical y potencialmente la necrosis del tejido. Particularmente, se ha asociado el fracaso endodóntico también con la morfología atípica del sistema de conductos radiculares caracterizado por la presencia de istmos, deltas apicales o conductos accesorios, los cuales generan limitantes durante la realización de los tratamientos. En este intrincado sistema hay espacios de imposible acceso que no logran ser tratados con los instrumentos endodónticos convencionales ni por los irrigantes durante la preparación químico-biomecánica, quedando amplias áreas en las paredes dentinales sin instrumentar y descontaminar, favoreciendo la permanencia de las bacterias en los túbulos dentinales impidiendo su eliminación. La principal etiología relacionada al fracaso de los tratamientos endodónticos es la persistencia de microorganismos en el sistema de conductos radiculares.

20

25

30

La medicación intra-conducto ha sido recomendada en casos de conductos necróticos o infectados para eliminar las bacterias que no son afectadas por la preparación químico-mecánica y sustancias más frecuentemente empleadas en la medicación intra-conducto es el hidróxido de calcio (Ca(OH)_2). Sin embargo, el hidróxido de calcio ha mostrado varias limitaciones, tales como baja efectividad frente a microorganismos altamente resistentes como *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*; baja solubilidad y pobre difusión de los iones hidroxilo; susceptibilidad a ser inactivado por el pH; y difícil eliminación de los túbulos dentinales.

Por lo tanto, nuevas estrategias están siendo evaluadas para mejorar los procesos de desinfección y tratar infecciones de la cavidad oral, entre ellos se encuentra el propóleo, un producto de origen natural fabricado por la abeja *Apis mellifera* que contienen importantes compuestos farmacológicamente activos que han demostrado propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias.

Por ejemplo, la patente WO2014/176654 divulga composiciones con actividad antimicrobiana que comprenden compuestos activos de extractos de propóleo secos, en donde dichas composiciones pueden ser utilizadas en odontología, así como en aplicaciones en la industria farmacéutica, en la industria de alimentos y en veterinaria. En particular, las composiciones comprenden extractos hidroalcohólicos o extractos secos de propóleo en concentraciones entre 5% y 40% p/p; miel orgánica en una concentración entre 1% y 10% p/p; y excipientes farmacéuticamente aceptables; en donde los extractos de propóleo presentaron en mayor proporción compuestos tales como ácido cafeico, ácido p-cumárico, dihidrocanferida, drupanina, apigenina, poliéster de ácido cafeico, pinocembrina, crisina, galangina, acacetina y artepilina C.

De otro lado, la patente WO2020/169425 divulga un extracto líquido de propóleo, así como formulaciones farmacéuticas, cosméticas o agroquímicas del mismo, las cuales son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o infecciosas (bacterianas o fúngicas). Particularmente, el extracto divulgado consiste en: a) un extracto seco de propóleo a una concentración de 0,1 a 10% p/p; y b) un solvente de extracción a una concentración de 90,0 a 99,9% p/p, en donde el solvente de extracción consiste en b.1) uno o más tipos de polietilenglicol líquidos 200-600 al 96,5-99,9% p/p; y b.2) lecitina o hidrolizado de lecitina al 0,1-3,5% p/p. De acuerdo con esta patente, el extracto de propóleo se estandariza a partir de: (I) una relación cuantitativa en peso de propóleo crudo como medicamento y extracto final entre 1:2 a 1:20 p/p; y (II) contenido cuantitativo de sustancias activas de propóleo seleccionadas del grupo que consiste en ácido p-cumárico, ácido transferílico; ácido cafeico y 2-feniletíl-3,4-dihidroxycinamato.

Finalmente, el artículo de Skaba *et al.* de 2013 (Influence of the toothpaste with brazilian ethanol extract propolis on the oral cavity health. Evid Based Complement Alternat Med; 215391), presenta los resultados de un estudio dirigido a evaluar el impacto de extractos

etanólicos de propóleo brasileño sobre la salud oral. Los resultados descritos en dicho documento evidencian la actividad antioxidante del extracto de propóleo evaluado, con valores de $2694,87 \pm 100,60 \mu\text{moles Trolox/g}$ en el ensayo de reducción férrica (FRAP, por sus siglas en inglés); $1230,07 \pm 135,55 \mu\text{moles Trolox/g}$ en el ensayo con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH); y $223,06 \pm 137,40$ en el ensayo ABTS. Adicionalmente, el estudio reveló que en concentraciones de 50 mg/L, el extracto etanólico de propóleo exhibió actividad antimicrobiana dependiente del tiempo tanto frente a bacterias Gram positivas (i.e. *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*), como frente a levaduras (i.e. *Candida albicans*). Por último, los análisis clínicos demostraron que cremas dentales enriquecidas con el extracto de propóleo en una concentración de 3% permite la remoción efectiva de placa dental y mejora el estado del periodonto marginal.

Si bien en el estado del arte se encuentran distintos estudios relacionados con composiciones que comprenden propóleos o extractos del mismo, aún existe la necesidad de generar formulaciones antimicrobianas adecuadas para uso odontológico, particularmente en endodoncia, que adicionalmente exhiban baja toxicidad frente a tejidos gingivales.

BREVE DESCRIPCIÓN

El presente desarrollo corresponde a una composición antimicrobiana odontológica que comprende un extracto etanólico de propóleos y un vehículo odontológicamente aceptable, en donde el extracto etanólico de propóleos comprende uno o más compuestos tipo flavonoides, fenoles, flavonas y derivados del ácido hidroxicinámico. Las composiciones aquí descritas permiten eliminar microorganismos asociados al desarrollo de infecciones y/o lesiones endodónticas primarias como *S. gordonii*, *A. israelli*, *F.nucleatum*, *P.endodontalis* en cultivos planctónicos o por filtración de bacterias como *E.faecalis* planctónico y en biofilm en conductos endodónticos ya tratados y que requieren retratamiento. Adicionalmente, la composición descrita exhibe actividad antioxidante, así como baja citotoxicidad frente a fibroblastos gingivales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Perfiles cromatográficos de los metabólicos presentes en los extractos etanólicos de propóleos.

5

FIG. 2 Imágenes de microscopia de epifluorescencia de *Enterococcus faecalis* en estado planctónico, tratadas con cuatro variedades del extracto de propóleos. Hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOCl, agua y vehículo (etanol al 1%). Donde A: corresponde a la máxima concentración evaluada del extracto, B y C: concentraciones intermedias y D: concentración más baja del extracto etanólico de propóleos. Fluorescencia verde indica que la bacteria está viva y fluorescencia roja indica que la bacteria está muerta.

10

FIG. 3 Reconstrucción tridimensional de resultados de eficacia antimicrobiana de extractos de propóleos sobre un biofilm monoespecie con *E. faecalis*. Hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$); clorhexidina al 2% (CHX 2%); vehículo (Etanol 1%); controles de crecimiento bacteriano (agua y medio), en donde A: corresponde a la máxima concentración evaluada, B y C: concentraciones intermedias y D: concentración más baja del extracto etanólico de propóleos. Fluorescencia verde indica que la bacteria está viva y fluorescencia roja indica que la bacteria está muerta.

20

FIG. 4 Citotoxicidad de las composiciones de propóleos evaluadas sobre fibroblastos gingivales (HGnF 2620) determinada por el método resazurina. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control (células sin estimular). * representa la diferencia estadística con respecto al grupo control o sin estímulo ($P < 0,05$). Cada barra representa la media en porcentaje e.s.m. de tres experimentos independientes por triplicado para cada tratamiento. A - Composición 1; B - Composición 2; C - Composición 3; D - Composición 4.

25

FIG. 5 Citotoxicidad de las composiciones de propóleos evaluadas sobre la línea celular L929 determinada por el método resazurina. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control (células sin estimular). *Representa la diferencia estadística con respecto al grupo control o sin estímulo ($P < 0,05$). Cada barra representa la media en porcentaje e.s.m. de tres experimentos independientes por triplicado para cada

30

tratamiento. A - Composición 1; B - Composición 2; C - Composición 3; D - Composición 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5

Para propósitos de interpretar los términos usados a lo largo del presente documento se debe tener en cuenta su significado usual en el campo técnico, a menos que se incorpore una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

10

Composición antimicrobiana odontológica

El presente desarrollo está dirigido a una composición antimicrobiana odontológica que comprende un extracto etanólico de propóleos y un vehículo odontológicamente aceptable, en donde el extracto etanólico de propóleos comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo conformado por: ácido elágico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido 3,4-O-dimetilcaféico, O-metilquercetina, pinobanksina, O-metilpinocembrina, apigenina, kaempferol, O-metilcrisina, ramnetina, galangina, acacetina, O-dimetilquercetina, O-metilcrisoeriol, 3-O-propionato pinobanksina, 3-O-pentanoato O-metilpinobanksina, 3-O-butirato pinobanksina y 3-O-pentenoato pinobanksina. En algunas modalidades particulares, la concentración del extracto etanólico de propóleos en la composición antimicrobiana odontológica es 10 µg/mL a 2000 µg/mL, 25 µg/mL a 1000 µg/mL, 50 µg/mL a 500 µg/mL, o 100 µg/mL a 250 µg/mL.

25 Para efectos de la presente divulgación, un “vehículo odontológicamente aceptable” corresponde a un material o combinación de materiales no tóxicos que pueden ser utilizados en una composición de uso odontológico sin afectar las propiedades de los compuestos activos. El vehículo odontológicamente aceptable de la presente divulgación puede contener la combinación de dos o más de las siguientes sustancias, pero no se limita a: etanol, agua, 1,2-propilenglicol, polietilenglicol, alcohol polivinílico, glicerina, óxido de zinc, hidróxido de calcio, hidróxido de bario, o una combinación de los mismos.

30

Usos

En modalidad particulares, la composición antimicrobiana odontológica aquí descrita se utiliza para el tratamiento de infecciones bacterianas en la cavidad oral. En modalidades aún más particulares, la composición antimicrobiana odontológica se utiliza en el tratamiento de infecciones bacterianas endodónticas, particularmente en aplicaciones intraconducto en endodoncia.

EJEMPLOS

El desarrollo tecnológico se presenta en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

Ejemplo 1. Extracción y caracterización química de propóleos

Extracción de productos a partir de material crudo

El procedimiento de exploración y recolección del propóleos se realizó en las siguientes áreas geográficas del Departamento del Huila: Quebradón Sur (2.450 mts), Los Andes (2.200 mts), Arcadia (1.700 mts) y Algeciras (1.200 mts), mediante las técnicas de raspado y trampa plástica importada.

A las muestras de material seco crudo se les retiró las impurezas mecánicas, se trituraron y maceraron hasta alcanzar una homogenización del material, se realizó la extracción de componentes principales mediante etanol al 96% y propóleo mecánicamente limpio en una solución 85/15 (85% solvente y 15% de propóleos) se agitaron y se dejaron en oscuridad con el fin de evitar alteraciones en los metabolitos obtenidos; a temperatura ambiente durante 72 horas para iniciar el proceso de extracción de los metabolitos de acuerdo a su polaridad. Posteriormente se filtraron en un embudo con papel filtro y para retirar el solvente etanólico, los filtrados fueron sometidos a rota evaporación a una temperatura de 40°C hasta sequedad. El material obtenido se almacenó en viales y se dejó en un desecador con el fin de retirar los residuos del disolvente. Con el fin de obtener un mayor rendimiento del proceso de extracción se realizaron 3 aclaramientos con etanol al 96% con un tiempo cada uno de 48 horas.

Luego del proceso de extracción y secado por rotaevaporación de los diferentes propóleos se obtuvieron extractos etanólicos secos (EEP) que se almacenaron en desecador y a la oscuridad para evitar la humedad y la degradación de los metabolitos. De acuerdo con el origen de las áreas geográficas donde se obtuvo la materia cruda, la nomenclatura del extracto etanólico es: EEp1 (Origen Algeciras), EEp2 (Origen Arcadia), EEp3 (Origen Otás), EEp4(Origen Quebradón).

Identificación de compuestos contenidos en los extractos

- 10 Para la determinación de los componentes obtenidos en cada extracto, se recolectaron 100 mg del extracto seco y se diluyeron en 5 mL de etanol al 96%. Posteriormente, cada mezcla fue filtrada por una membrana de 0,5 μ m y analizada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrometría de masas de alta resolución.
- 15 Como se observa en la Tabla 1 y la Figura 1, los 19 metabolitos principales identificados fueron: ácido elágico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido 3,4-Odimetilcaféico, O-metilquercetina, pinobanksina, O-metilpinocembrina, apigenina, kaempferol, O-metilcrisina, ramnetina, galangina, acacetina, O-dimetilquercetina, O-metilcrisoeriol pinobanksina 3-O-propionato, O-metilpinobanksina 3-O-pentanoato, pinobanksina 3-O-butirato, pinobanksina 3-O-pentenoato.
- 20

Tabla 1. Principales componentes identificados en los extractos etanólicos de propóleos EEp1, EEp2, EEp3 y EEp4.

Señal No.	Tiempo de retención (min)	% Abundancia relativa				m/z ([M+H] ⁺)	Fórmula	Error (ppm)	Anotación
		EEp1	EEp2	EEp3	EEp4				
1	7,3	2,7	0,2	7,1	1,4	300,9972	C ₁₄ H ₆ O ₈	4,14	ácido elágico
2	7,5	1,0	0,0	1,9	0,0	163,0388	C ₉ H ₈ O ₃	4,42	ácido p-cumárico
3	8,1	1,2	0,1	5,9	1,7	193,0511	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-5,26	ácido ferúlico
4	9,0	2,9	0,3	7,6	1,0	207,0649	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	4,03	ácido 3,4-O-dimetilcaféico
5	9,8	0,1	0,5	0,0	0,0	315,0512	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-2,29	O-metilquercetina
6	10,1	1,8	0,9	2,3	2,5	271,0613	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	-2,40	pinobanksina
7	10,3	0,0	0,4	0,0	0,0	283,0959	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	4,01	O-metilpinocembrina
8	10,5	1,6	0,5	1,0	1,1	269,0462	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-4,46	apigenina
9	10,8	1,2	0,1	0,9	4,7	285,0391	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2,86	kaempferol
10	12,7	3,9	16,8	0,0	11,7	267,0648	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	3,50	O-metilcrisina
11	13,8	1,4	0,4	0,9	4,1	315,0512	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	-2,29	ramnetina

12	14,4	6,2	8,3	4,8	9,0	269,0461	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-4,09	galangina
13	14,8	1,1	0,6	0,6	1,0	283,0614	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-2,65	acacetina
14	15,2	4,8	1,3	0,0	8,3	329,0672	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	-3,25	O-dimetilquercetina
15	15,4	55,9	59,8	55,5	30,4	313,0703	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	2,92	O-metilcrisoeriol
16	15,7	2,8	1,4	1,5	4,3	327,0855	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	4,17	pinobanksina 3-O-propionato
17	16,0	3,5	2,9	3,1	4,2	373,1643	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	2,18	O-metilpinobanksina 3-O-pentanoato
18	16,3	1,3	1,8	1,9	2,1	341,1033	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	-2,30	pinobanksina 3-O-butirato
19	17,5	6,6	3,7	5,2	12,6	353,1015	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	2,87	pinobanksina 3-O-pentenoato

Para los análisis de eficacia antimicrobiana y citotoxicidad, se prepararon las Composiciones 1, 2, 3 y 4 a partir de una solución etanólica al 1% mezclada con los extractos EEp1, EEp2, EEp3 y EEp4, respectivamente, en distintas concentraciones (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones evaluadas de los extractos de propóleos.

Composiciones	Concentración de Propóleos (µg/mL)			
	[A]	[B]	[C]	[D]
1	1000	500	250	100
2	500	250	100	50
3	100	50	25	10
4	1000	500	250	100

Ejemplo 2. Análisis de eficacia antimicrobiana

2.1 Evaluación de eficacia antimicrobiana en cultivo planctónico

La eficacia antimicrobiana de las Composiciones 1 a 4 fue evaluada en cultivos planctónicos de cepas asociadas a infecciones endodónticas primarias y retratamiento como *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Actinomyces israelii* ATCC 12012, *Streptococcus gordonii* ATCC 10558, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 mediante dos técnicas de laboratorio: Ensayos de letalidad y viabilidad bacteriana mediante microscopía de epifluorescencia con Live/Dead® BacLight (Molecular Probes).

Ensayo de letalidad

Cultivos planctónicos de cada una de las bacterias de estudio fueron expuestos por 3, 7 y 14 días a cada una de las Composiciones 1 a 4. Después de la exposición, la mezcla bacteria/composición fue sembrada por plaqueo en medios de cultivo apropiados para el crecimiento de cada una de las bacterias y posterior a la incubación, se revisó el crecimiento bacteriano en el grupo control no expuesto y en el grupo tratado con los productos naturales.

Se calculó el porcentaje de reducción de al menos 1 logaritmo del recuento bacteriano, después de la exposición a cada uno de los tratamientos.

$$[(a - b) / a] \times 100$$

a = UFC/mL en la población control (sin tratamiento con propóleos)

b = UFC/mL de sobrevivientes en la prueba, después de la exposición

Reducción del Log₁₀ = Log₁₀ (UFC/mL en la población control) – Log₁₀ (UFC/mL de sobrevivientes de la exposición).

Tal como se detalla en la Tabla 3, las Composiciones 2 y 4 presentaron alta eficacia en la inhibición de los microorganismos evaluados, disminuyeron la viabilidad bacteriana por encima del 80%.

Tabla 3. Datos descriptivos de eficacia planctónica en cepas endodónticas primarias y secundarias

Microorganismos	Eficacia			
	Composición 1	Composición 2	Composición 3	Composición 4
<i>E. faecalis</i>	Inhibición parcial	Inhibición total	Inhibición parcial	Inhibición total
<i>A. israelii</i>	Inhibición parcial	Inhibición total	Inhibición parcial	Inhibición total
<i>S. gordonii</i>	Inhibición parcial	Inhibición total	Inhibición parcial	Inhibición total
<i>P. endodontalis</i>	Inhibición parcial	Inhibición total	Inhibición total	Inhibición total
<i>F. nucleatum</i>	No inhibición	Inhibición total	No inhibición	Inhibición parcial

Asimismo, se encontró que las Composiciones 2 y 4 disminuyeron más de un logaritmo la concentración bacteriana en cultivo planctónico, lo que permitiría validar la calidad antimicrobiana de estos extractos.

5 Viabilidad bacteriana

Cultivos planctónicos de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fueron expuestos por 3, 7 y 14 días a cada una de las Composiciones 1 a 4 en las diferentes concentraciones detalladas en la Tabla 2. Después de la exposición, la mezcla bacteria/composición fue
10 centrifugada a 14.000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue removido y el pellet fue resuspendido con 50 µL excedentes del sobrenadante, el exceso de sobrenadante fue descartado. A los 50 µL del pellet se le adicionaron 0,15 µL de la mezcla de viabilidad (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability, Molecular Probes®) en una relación 1:1, que contiene dos colorantes SYTO 9 y yoduro de propidio, lo que permite diferenciar las
15 bacterias con membrana intacta (fluorescencia verde) de las que tienen la membrana alterada (fluorescencia roja). La muestra fue incubada en condiciones de penumbra durante 15 minutos y posteriormente observadas en el microscopio de fluorescencia (Axio-Imager. A2. Zeiss®) en aumento 100X y se digitalizaron usando el software AxioVision LE 4.8 (Zeiss Microscopy). Para este ensayo, se realizaron controles de
20 viabilidad con agua, vehículo y control de crecimiento con medio de cultivo; así como controles de muerte con hidróxido de calcio ((Ca(OH)₂), clorhexidina (CHX) e hipoclorito de sodio (NaOCl) 5,25%.

Las imágenes de microscopia de fluorescencia (Figura 2) revelaron que las
25 Composiciones 2 y 4 presentaron una alta eficacia antimicrobiana en sus concentraciones más altas (A y B), observando que las composiciones logran afectar la viabilidad de las bacterias por encima del 90%.

2.2 Evaluación de eficacia antimicrobiana en un modelo de biofilm

30

Se evaluó la eficacia antimicrobiana de las composiciones sobre biopelículas formadas en dientes humanos previo aval ético de acuerdo a lo reportado por Gutiérrez y colaboradores (Gutiérrez DM, Castillo Y, Ibarra-Avila H, *et al.* 2022. A new model for the formation of an *Enterococcus faecalis* endodontic biofilm with nutritional

restriction. *J Basic Microbiol*; 62(1): 13-21). Posterior a la formación de las biopelículas monoespecie con *E. faecalis*, se verificó estructura mediante microscopía electrónica de barrido (FE-SEM) y la viabilidad bacteriana y biovolumen del biofilm se determinó mediante microscopía láser confocal (CLMS). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en experimentos independientes.

Las biopelículas formadas fueron tratadas con las Composiciones 2 y 4, a las concentraciones A, B, C, D, debido a que fueron las composiciones que demostraron mejor eficacia antimicrobiana en la evaluación planctónica. Estas biopelículas fueron expuestas a las dos composiciones durante 3 y 7 días en experimentos independientes. Se emplearon como controles de viabilidad biopelículas tratadas con agua y con caldo Brain Heart Infusion (BHI); como controles de muerte se empleó clorhexidina al 2% (CHX 2%), como vehículo se empleó etanol al 1% y Ca(OH)_2 como control positivo.

Posterior a los tratamientos, la viabilidad bacteriana en el biofilm fue analizada con el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead L7012 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) que contiene dos marcadores de ácidos nucleicos SYTO9 (que permite la tinción de bacterias viables) y yoduro de propidio (que tiñe las bacterias no viables) (YP). La relación de volumen de fluorescencia verde y roja indicaba la proporción de células viables y no viables, para realizar la reconstrucción tridimensional y calcular biovolumen, se utilizó el software Imaris 8.0 (Bitplane Inc., Saint Paul, MN, EE. UU).

Se observa de manera general que las Composiciones 2 y 4 a las concentraciones más altas (A: 500 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) disminuyen la viabilidad de las bacterias en biofilm por encima del 97% siendo incluso más efectivos que el producto *Gold standard* en odontología (Ca(OH)_2), el cual redujo la viabilidad bacteriana solo en 5% (Figura 3).

Adicionalmente, como se observa en la Tabla 4, las composiciones evaluadas reducen significativamente el espesor o biovolumen de las biopelículas, siendo este efecto mucho más evidente con la Composición 4, que redujo el biovolumen de 456,9 μm^3 a 100,3 μm^3 después de la exposición durante 3 días y manteniendo su efecto hasta los 7 días de tratamiento.

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad y biovolumen de biofilm tratados con extractos de propóleos.

Condición	Tratamiento 3 días		Tratamiento 7 días	
	Viabilidad (%)	Biovolumen (μm^3)	Viabilidad (%)	Biovolumen (μm^3)
Línea basal del biofilm	75	456,909	75	456,909
Vehículo	70	426,872	67	283,433
Control viabilidad (agua)	71	425,470	73	334,807
Control viabilidad (BHI)	76	447,320	75	602,801
Control muerte (CHX 2%)	5	332,102	2	294,165
Ca(OH)₂	95	27,876	95	6,920
Composición 2 (500 $\mu\text{g/mL}$)	4	334,236	3	308,467
Composición 2 (250 $\mu\text{g/mL}$)	11	243,323	1	208,423
Composición 2 (100 $\mu\text{g/mL}$)	27	205,899	15	69,662
Composición 2 (50 $\mu\text{g/mL}$)	79	354,400	72	132,949
Composición 4 (1000 $\mu\text{g/mL}$)	3	100,353	4	103,299
Composición 4 (500 $\mu\text{g/mL}$)	11	248,532	12	207,847
Composición 4 (250 $\mu\text{g/mL}$)	44	126,705	22	113,024
Composición 4 (100 $\mu\text{g/mL}$)	48	225,624	48	206,816

Así las cosas, las Composiciones 2 y 4 demostraron una alta eficacia antimicrobiana en cultivos planctónicos, disminuyendo la viabilidad bacteriana por encima del 80%, y en biofilm monoespecie de *Enterococcus faecalis*, afectando viabilidad y biovolumen.

Ejemplo 3. Análisis de citotoxicidad

Para la evaluación de la citotoxicidad de cada una de las composiciones evaluadas, se utilizaron cultivos celulares de la línea celular de piel de ratón lactante L929 (ATCC®

CRL-6364™) y la línea celular HGnF 2620 (Sciencell) de fibroblastos gingivales aislados de gingiva humana. Los cultivos se mantuvieron con medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado al 10% de suero fetal bovino (Hyclone®) penicilina-estreptomicina (100 UI - 100 µg/mL) en frascos de cultivo celular de 75 cm²,
5 a 37 °C con 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Para el mantenimiento de los cultivos, se realizó un cambio de medio cada dos días hasta obtener una confluencia celular del 80%. Los pases celulares para la generación de sub-cultivos se hicieron incubando las células por 5 minutos en una solución de tripsina al 0,025% v/v - EDTA 0,03% v/v a 37°C, y resembrando en cajas de 75 cm² en condiciones ideales para el
10 crecimiento celular.

Los cultivos celulares en crecimiento exponencial y con un 90% de confluencia fueron tripsinizados incubando por 5 minutos en una solución de tripsina al 0,025% v/v-EDTA 0,03% v/v a 37°C, se centrifugaron a 1.800 rpm durante 3 minutos y se contaron en
15 cámara de Neubauer. Para la determinación de la CC₅₀ las células fueron sembradas en placas de 96 pozos de fondo plano a una concentración de 5 x 10³ células/pozo en un volumen de 100 µL/pozo de DMEM suplementado. Se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas experimentales.

20 Las placas fueron pre-incubadas por 24 horas para permitir adherencia de las células en los pozos. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron las Composiciones 1, 2, 3 y 4 a concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25 y 50 mg/mL, para posterior incubación por 48 horas.

25 Se utilizaron los métodos colorimétricos de resazurina y MTT para cuantificar la viabilidad celular después del tratamiento, basándose en la alta correlación que existe entre la cantidad de resazurina y MTT metabolizada y el número de células vivas y/o metabólicamente activas. Posterior al tiempo del tratamiento (48 horas), se retiraron los extractos, se realizaron lavados con PBS y se adicionaron 100 µL de una solución de
30 resazurina 0,44 µM preparada y 0,25 mg/mL de MTT preparados en medio de cultivo sin suplementar. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 4 horas. La fluorescencia de la resazurina (530 nm - 590 nm) y la absorbancia del MTT (570 nm con filtro diferencial 590 nm) fue leída en un lector de placas (TECAN). Los valores de fluorescencia y absorbancia fueron transformados a porcentajes de viabilidad celular y graficados en

función del logaritmo de la concentración de tratamiento (Figuras 4A-D y 5A-D).

El nivel de toxicidad fue determinado con base a la Norma ISO 10993, donde se destaca la clasificación de citotoxicidad con base al porcentaje de viabilidad celular: 100 - 75%:

- 5 No citotóxico; 74 - 50%: Ligeramente citotóxico; 49 - 25%: Moderadamente citotóxicos; 24 - 0%: Extremadamente citotóxico.

De las composiciones evaluadas, la que produjo mayor toxicidad en la línea celular de fibroblastos gingivales humanos HGnF fue la Composición 1, con una CC₅₀ de 0,8681 mg/mL (Tabla 6), siendo extremadamente citotóxico en el rango de 1 a 50 mg/mL. La Composición 2 fue la más segura para los HGnF con una CC₅₀ de 4,288 mg/mL. Las Composiciones 3 y 4 tuvieron una CC₅₀ de 2,833 y 1,701 mg/mL, respectivamente, disminuyendo la viabilidad celular desde 5 mg/mL hasta 1 mg/mL. Las réplicas biológicas realizadas ratificaron los valores de supervivencia obtenidos por este método.

15

Asimismo, se evaluó la toxicidad de los propóleos con el método fluorimétrico de resazurina. Los resultados de toxicidad por este método fueron similares a los obtenidos con el MTT sobre los fibroblastos gingivales (Tabla 5). De las composiciones evaluadas, la que produjo mayor toxicidad medida con resazurina los HGnF fue la Composición 1, con una CC₅₀ de 0,9334 mg/mL, siendo extremadamente citotóxico en el rango de 1 a 50 mg/mL. La Composición 2 fue la más segura para los HGnF con una CC₅₀ de 4,14 mg/mL. Las Composiciones 3 y 4 tuvieron una CC₅₀ de 2,578 y 0,9334 mg/mL respectivamente, disminuyendo la viabilidad celular desde 5 mg/mL hasta 1 mg/mL.

25 **Tabla 5.** Concentraciones citotóxicas 50 (CC₅₀) de extractos de propóleos sobre la línea celular HGnF.

Composición/ CC ₅₀ (mg/mL)	Resazurina	MTT
1	0,8681	0,9334
2	4,288	4,14
3	2,833	1,849
4	1,701	2,578

Los resultados de la citotoxicidad realizados sobre la línea celular de fibroblastos murinos L929 por el ensayo MTT y resazurina (Tabla 6) mostraron que la Composición 2 produjo mayor toxicidad y muerte de la línea celular L929 con CC₅₀ de 4,34 y 5,59 mg/mL

30

respectivamente después de 48 horas de exposición. La Composición 1 produjo menor toxicidad con CC_{50} de 0,595 y 0,5293 mg/mL respectivamente. Las Composiciones 3 y 4 exhibieron una toxicidad moderada con CC_{50} de 2,865 y 2,189; 0,750 y 2,57 mg/mL, respectivamente.

5

Tabla 6. Concentraciones citotóxicas 50 (CC_{50}) de extractos de propóleos sobre la línea celular L929.

Composición/ CC_{50} (mg/mL)	Alamar Blue	MTT
1	0,595	0,5293
2	4,34	4,59
3	2,865	2,189
4	0,750	2,57

Con base en lo anterior, las Composiciones 2 y 4 no solo presentaron la mejor eficacia antimicrobiana, sino que demostraron ser las más seguras con una CC_{50} de 4,14 mg/mL y 0,9334 mg/mL, respectivamente.

10

Ejemplo 4. Análisis de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las composiciones de propóleos fue evaluada mediante la capacidad captadora del radical DPPH utilizando la metodología de Rojano y colaboradores (Rojano B. *et al.* 2008. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5- methylphenol). *J Mol Struct*; 877(1-3): 1-6). Brevemente, un volumen de 990 μ L de una solución metanólica de DPPH se mezcló con 10 μ L de las composiciones en varias concentraciones; las mezclas se dejaron en reposo y en ausencia de luz durante 30 minutos, posterior a lo cual se determinó la absorbancia de las muestras a 517 nm. Los resultados se determinaron como la IC_{50} de cada uno de los productos. El antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) se usó como control positivo.

20

25

En comparación con un valor de IC_{50} de 30,78 ppm obtenido con el control, las Composiciones 2 y 4 exhibieron los resultados más prometedores, con valores de IC_{50} de 37,42 ppm y de 38,19 ppm, respectivamente. Estos resultados sugieren que las Composiciones 2 y 4 tienen potencial como productos antiinflamatorios para uso en odontología.

30

Ejemplo 5. Elaboración de formulaciones con extractos de propóleos para uso odontológico

Con base en los resultados de efectividad antimicrobiana obtenidos con las Composiciones 1 a 4, se generaron formulaciones adicionales dirigidas a tratamientos intraconducto mediante la incorporación de otros componentes farmacéutica u odontológicamente aceptables, tal como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Formulaciones de uso odontológico con extractos de propóleo.

Formulación	Componentes	Proporciones	Características
1	EEp	1 g	Solución marrón oscura, uniforme y sin partículas
	Alcohol etílico 96%	5 mL	
2	EEp	200 mg	Solución marrón claro, uniforme y sin partículas
	Alcohol etílico 96%	0,001 L	
	Agua	1,0 L	
3	EEp	1 g	Gel traslucido, uniforme, viscosa y sin partículas
	1,2-propilenglicol	5 mL	
4	EEp	1 g	Gel traslucido uniforme, viscosa y sin partículas
	Polietilenglicol 400	5 mL	
5	EEp	1 g	Gel traslucido, uniforme, baja viscosidad y sin partículas
	1,2-propilenglicol	2,5 mL	
	Alcohol etílico 96%	2,5 mL	
6	EEp	1 g	Gel traslucido, uniforme, baja viscosidad y sin partículas
	Poletilenglicol 400	2,5 mL	
	Alcohol etílico 96%	2,5 mL	
7	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón claro, uniforme y sin grumos. Fácil maleabilidad y fluidez
	1,2-propilenglicol	1 mL	
	Óxido de zinc	500 mg	
8	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón claro, uniforme y sin grumos. Fácil maleabilidad y fluidez
	Poletilenglicol 400	1 mL	
	Óxido de zinc	500 mg	

9	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón oscuro, con partículas gruesas oscuras y sin grumos. Fluida.
	1,2-propilenglicol	1 mL	
	Alcohol etílico 96%	1 mL	
	Óxido de zinc	500 mg	
10	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón oscuro, con partículas gruesas oscuras y sin grumos. Fluida.
	Polietilenglicol 400	1 mL	
	Alcohol etílico 96%	1 mL	
	Óxido de zinc	500 mg	
11	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón claro, uniforme y sin grumos. Fácil maleabilidad y fluidez
	1,2-propilenglicol	1 mL	
	Oxido de zinc	500 mg	
	Hidróxido de calcio	100 mg	
12	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón claro, uniforme y sin grumos. Fácil maleabilidad y fluidez
	Polientilenglicol	1 mL	
	Óxido de zinc	500 mg	
	Hidróxido de calcio	100 mg	
13	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón claro, uniforme y sin grumos. Fácil maleabilidad y fluidez
	1,2-propilenglicol	1 mL	
	Óxido de zinc	500 mg	
	Hidróxido de bario	50 mg	
14	EEp	200 mg	Pasta / suspensión sólida marrón claro, uniforme y sin grumos. Fácil maleabilidad y fluidez
	Polietilenglicol	1 mL	
	Óxido de zinc	500 mg	
	Hidróxido de bario	50 mg	

Las composiciones obtenidas mantienen las concentraciones efectivas de propóleo sin afectar las propiedades de los compuestos activos y se adaptan a las formas farmacéuticas para el tratamiento endodóntico.

REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana odontológica que comprende:

a) un extracto etanólico de propóleos y

5 b) un vehículo odontológicamente aceptable;

en donde el extracto etanólico de propóleos comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo conformado por: ácido elágico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido 3,4-O-dimetilcaféico, O-metilquercetina, pinobanksina, O-metilpinocembrina, apigenina, kaempferol, O-metilcrisina, ramnetina, galangina, acacetina, O-
10 dimetilquercetina, O-metilcrisoeriol, 3-O-propionato pinobanksina, 3-O-pentanoato O-metilpinobanksina, 3-O-butirato pinobanksina y 3-O-pentenoato pinobanksina.

2. La composición antimicrobiana odontológica de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el extracto etanólico de propóleos está en una concentración entre 10 µg/mL a
15 2000 µg/mL.

3. La composición antimicrobiana odontológica de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, en donde el vehículo odontológicamente aceptable se selecciona del grupo que comprende etanol, 1,2-propilenglicol, polietilenglicol, alcohol polivinílico, glicerina,
20 óxido de zinc, hidróxido de calcio, hidróxido de bario, agua, o una combinación de los mismos.

4. La composición antimicrobiana odontológica de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición está en forma de tintura, gel o pasta.

25

RESUMEN

La presente divulgación hace referencia a una composición antimicrobiana odontológica que comprende un extracto etanólico de propóleos y un vehículo odontológicamente aceptable, en donde el extracto etanólico de propóleos comprende uno o más compuestos tipo flavonoides, fenoles, flavonas y derivados del ácido hidroxicinámico. La composición antimicrobiana odontológica exhibe una alta eficacia antimicrobiana frente a bacterias asociadas al desarrollo de infecciones y/o lesiones endodónticas, así como actividad antioxidante y baja toxicidad frente a tejidos gingivales.

10