

78015-PCT

**COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA ORAL PARA PREVENIR Y/O TRATAR
ENFERMEDADES DE LOS TEJIDOS BLANDOS Y DUROS QUE RODEAN AL DIENTE
EN LA CAVIDAD BUCAL**

5

MEMORIA DESCRIPTIVA

CAMPO DE APLICACIÓN

La presente invención se refiere al campo de la medicina oral u odontología, más particularmente a composiciones farmacéuticas que sirven para prevenir y/o tratar enfermedades de los tejidos
10 blandos y duros que rodean al diente, presentes en la cavidad bucal, en especial para prevenir y/o tratar la enfermedad periodontal.

ANTECEDENTES

La Enfermedad Periodontal (EP) es una afección inflamatoria-infecciosa y destructiva de los tejidos que rodean al diente. A pesar de los avances científicos y esfuerzos económicos, sigue
15 afectando en todo el mundo a más del 90% de los adultos, comprometiendo la pérdida de dientes en gran parte de los afectados, generando un enorme gasto en salud y detrimento de la calidad de vida de la población.

Una serie de eventos celulares y moleculares ocurren como respuesta del acúmulo de las bacterias en la cavidad bucal. No obstante, aunque las bacterias son necesarias para iniciar la EP, es la
20 respuesta inmune la responsable de la destrucción de los tejidos periodontales.

Al suprimir las medidas de higiene oral, progresivamente van apareciendo signos de inflamación gingival (gingivitis), pero una vez que se retoman las medidas de higiene oral, los signos de gingivitis desaparecen y la encía vuelve a su estado inicial. Por esta razón es que se considera a la gingivitis una lesión reversible. Sin restablecer la higiene oral, este estado de gingivitis reversible

puede permanecer, en algunas personas, en forma crónica durante un tiempo indeterminado. Sin embargo, por motivos aún desconocidos, en algunas personas o bien bajo ciertas condiciones, la enfermedad pasa a una entidad destructiva llamada periodontitis (ver Figura 1). Este proceso toma tiempo, expresando así la naturaleza cíclica de la enfermedad, lo que a su vez se relaciona con otros factores que pueden hacer que se modifique la respuesta inflamatoria, enfermedades de base como la diabetes, hábitos como el tabaquismo, situaciones de estrés, entre otros, lo que la define, por lo tanto, como una enfermedad multifactorial.

Por otra parte, la inflamación-infección del tejido periodontal puede afectar otras zonas del cuerpo, siendo vinculada con diversas enfermedades generales (patologías cardiovasculares, diabetes mellitus, y parto prematuro, entre otras).

Por lo anterior, la EP es considerada una enfermedad compleja, en cuyo desarrollo participan bacterias, el huésped, y factores ambientales.

Según un estudio que estimó la prevalencia, severidad y extensión de periodontitis en la población adulta de los EE.UU. más del 47% de los individuos presentó periodontitis. Entre ellos, el 8,7 % fue diagnosticado con periodontitis leve, un 30% moderada, y el 8,5 % severa. Con respecto a la extensión de la enfermedad, el 56 % de la población adulta tuvo un 5% o más de sitios periodontales con pérdida de inserción ≥ 3 mm y el 18% presentaron un 5% de sitios con sacos periodontales ≥ 4 mm. La enfermedad periodontal fue mayor en hombres, americanos mexicanos, adultos con bajo nivel económico y educacional, y en los fumadores (Eke PI *et al*, Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. J Dent Res. octubre de 2012; 91(10):914-20).

Por otro lado, en Chile la prevalencia de enfermedad periodontal es mayor. Un estudio realizado en el año 2010 demostró que el 93,45% de los individuos entre 35 y 44 años presentaron una pérdida de inserción ≥ 3 mm y en el 38,65% de ellos se observó una pérdida de inserción ≥ 6 mm en al menos un sitio. Esta prevalencia aumentó en los adultos mayores entre 65 y 74 años de

edad, los que presentaron una pérdida de inserción $\geq$ a 3 mm en un 97,58% y $\geq$ a 6 mm en un 69.35% (Gamonal J. *et al*, Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. J Periodontol. octubre de 2010;81(10):1403-10).

Es evidente, por los índices de salud de la población, que aún se desconocen muchos aspectos de la EP, a pesar de ser la Periodoncia la disciplina odontológica que más conocimiento científico desarrolla.

La etiología de la periodontitis aún no se comprende del todo, ya que se han reportado diversos factores involucrados en su desarrollo, como la infección bacteriana, la respuesta inmune del huésped y factores ambientales (como patógenos virulentos, tabaquismo, higiene personal y ciertas enfermedades).

Diversos estudios han propuesto dos formas de periodontitis, una de ellas denominada como:

a) Periodontitis crónica, la cual afecta principalmente a la población mayor de 35 años. Se ha demostrado que este tipo de enfermedad se asocia con un consorcio bacteriano presente en el área subgingival, dentro del cual están presentes *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tanerella forsythia*.

b) Periodontitis agresiva, la cual se asocia principalmente a adultos jóvenes. Según un estudio de Arowojolu *et al*. encontraron una prevalencia entre edades que fluctuaban entre 17 -34 años, aunque puede desarrollarse a cualquier edad y se ha descrito que puede progresar de 3 a 4 veces más rápido y además afecta a un gran porcentaje de adolescentes. Este tipo de enfermedad se caracteriza, además de la comunidad microbiana subgingival mencionada anteriormente, por la presencia del organismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, el cual predomina en los sitios orales afectados.

La infección bacteriana es considerada como el factor etiológico principal de la EP. Sin embargo, recientes estudios se han centrado en el rol del sistema inmune en la evolución de esta patología,

lo que indica que antígenos bacterianos desencadenan una reacción inmuno-patológica, donde la susceptibilidad del paciente determinará el resultado final del proceso.

Se ha postulado que mientras que las bacterias comensales son bien toleradas, los patógenos periodontales producen una respuesta inmune evadiendo los mecanismos de control inmunológico del huésped, lo que termina con la activación de procesos de destrucción tisular.

Por lo tanto, la enfermedad periodontal es una enfermedad compleja multifactorial, en la que, si bien las bacterias son un factor fundamental en su etiología, la respuesta inmune que se desarrolla en el huésped es también altamente relevante.

En el proceso inmunológico que se produce durante el desarrollo de la enfermedad periodontal, participan una gran cantidad de células y moléculas, tales como linfocitos, neutrófilos, macrófagos, citoquinas, interleuquinas, factor de necrosis tumoral, entre otros, lo que convierte a esta patología un proceso complejo, del que todavía existe desconocimiento.

Más aún, si bien hay componentes que predominan más en la periodontitis y otros más en la gingivitis, muchos de ellos se encuentran en ambas, lo que hace difícil entender y describir un mecanismo exacto de progresión.

Lo que sí se sabe, es que existiría una condición reversible, llamada gingivitis, la cual puede permanecer en este estado por largo tiempo. O bien, dadas determinadas condiciones inmunológicas (aún desconocidas), la gingivitis puede progresar a una condición más compleja, irreversible y destructiva, la periodontitis, la cual no depende única y exclusivamente de las bacterias, sino que también de factores inmunológicos involucrados.

Por lo tanto, una respuesta inmunológica disfuncional, sería la causa de la predisposición a la destrucción de los tejidos.

La comprensión de la etiopatogenia de la enfermedad periodontal nos permitirá no solo desarrollar mecanismos de diagnóstico precoz de la enfermedad, identificar y explicar los factores intrínsecos y exógenos de riesgo periodontal, sino que también desarrollar nuevas estrategias preventivas y

terapéuticas, realmente efectivas para combatir una de las enfermedades más prevalentes de la población, y dar adecuada solución a un problema de salud pública, aún sin solución.

DESCRIPCIÓN DEL ARTE PREVIO

Existen distintos tipos de tratamiento de la enfermedad periodontal, entre los que se destaca el control químico de la enfermedad.

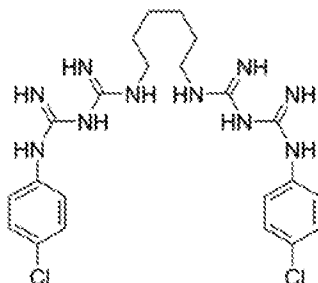
El rol y la utilidad de los productos químicos aplicados tópicamente se han investigado intensamente en periodoncia como un complemento a los procedimientos mecánicos para el control de la placa y asociados con la prevención y el tratamiento complementario de la enfermedad periodontal.

10 Enjuagues bucales

Los enjuagues orales, independientemente del agente químico usado, no penetran de manera significativa en el surco y/o en el bolsillo periodontal (0,2 mm), por lo que su acción se limita al control de la placa supragingival y la gingivitis de manejo terapéutico. Ni el nivel de profundidad al sondaje, ni el nivel de inserción se mejoran de manera significativa.

15 Clorhexidina

Es el agente anti-placa más investigado y eficaz. La clorhexidina químicamente corresponde a una bisbiguanidina con propiedades catiónicas. La molécula es simétrica, con dos anillos clorofenilo y dos grupos biguanidina conectados por una cadena de hexametileno central.



20 Se ha demostrado la interacción entre la molécula con carga positiva de clorhexidina y las cargas negativas que se encuentran en la pared celular bacteriana. Esto aumenta la permeabilidad celular

perdiendo el equilibrio osmótico y de ese modo producir la lisis bacteriana. También reduce la formación de la película sobre la superficie del diente y se altera la adhesión bacteriana.

Una propiedad importante de la clorhexidina es su alta sustentividad, es decir, la larga asociación entre un material y un sustrato, incluso más tiempo de lo esperado con una simple deposición mecánica. Esto promueve la liberación lenta del agente para el medio.

En el caso de la clorhexidina, su sustentividad es de 12 horas a una concentración de 0,12%. Por lo tanto, se considera un antibacteriano eficaz, bactericida en concentraciones altas, y bacteriostático en concentraciones bajas, como las diluidas gradualmente en la saliva.

Los resultados clínicos en relación con los niveles de disminución de la placa bacteriana supragingival y la inflamación gingival son 55% y 45% respectivamente. Los primeros estudios clínicos emplean una solución de 10 ml al 0,2% equivalente a 20 mg de clorhexidina por uso. Actualmente se utilizan, de acuerdo con la recomendación de la Asociación Dental Americana (ADA), 15 ml al 0,12% equivalente a 18 mg de clorhexidina. La cantidad del agente por uso es casi el mismo y los resultados clínicos son similares. Su concentración mínima inhibitoria (CMI) es de 8 a 500 mg/ml, estudiada para 52 bacterias aisladas de la placa subgingival. A una concentración de 250 mg/ml, toda bacteria aislada de pacientes con periodontitis fue inhibida. Las CMIs estaban todas bajo que el nivel alcanzado por la aplicación tópica. La resistencia antimicrobiana con clorhexidina no se ha detectado.

Entre los efectos adversos que presenta la clorhexidina se encuentran la alteración temporal del gusto y el aumento de los depósitos de cálculo de tinción (tinción dental).

Agentes químicos de primera generación

Corresponden a ciertos antibióticos, compuestos de amonio cuaternario, compuestos fenólicos, compuestos de flúor, agentes oxigenantes, povidona yodada. Entre los compuestos fenólicos el único producto que se ha estudiado es Listerine®, que incluyen composiciones de aceites esenciales de timol, mentol, eucaliptol y salicilato de metilo. El vehículo alcohólico de este agente

alcanza una concentración extremadamente alta de 26,9% con un pH de 5,0. Esto explica los efectos adversos asociados con la sensación urente bucal como resultado del daño epitelial y ulceración de las mucosas y alteraciones significativas en el sabor.

Agentes químicos de segunda generación

5 Los agentes químicos de segunda generación se caracterizan por una alta sustantividad (retención de 25 a 30% después de cada enjuague bucal durante un minuto). Tales compuestos son activos *in situ* durante horas (clorhexidina, fluoruro de amina, triclosán, cuando se combinan con ciertos compuestos). El triclosán es un antiséptico bisfenol, no iónico, con baja toxicidad y de amplio espectro antibacteriano. Debido a que no se une bien a las superficies orales, ya que carece de una

10 fuerte carga positiva, se han creado formulaciones que aumentan su capacidad para unirse a la placa y el diente (combinación con citrato de zinc para aumentar su potencial anti-placa y anti-sarro, la incorporación de un copolímero de metoxietileno y ácido maleico para aumentar su tiempo de retención). El triclosán en concentraciones de 0,2-0,5% y citrato de zinc en 0,5-1% favorece una reducción significativa en la placa y la gingivitis. El mismo efecto se ha logrado con

15 dentífricos que contienen 0,3% de triclosán y 0,25% de copolímero de metoxietileno y ácido maleico. Formulaciones de enjuague bucal en 0,3% han mostrado reducciones significativas en la placa y la gingivitis. Es importante destacar que el citrato de zinc tiene un efecto limitado en el crecimiento de bacterias en las superficies que han sido previamente limpiadas, pero tiene un gran efecto en las zonas con cantidades moderadas de placa. Esto indica que el principal efecto del

20 citrato de zinc es reducir la tasa de proliferación bacteriana en la placa ya formada. Por el contrario, el triclosán tiene un gran efecto sobre superficies libres de placa (después de cepillarse los dientes) y disminuye su potencial antibacteriano con el aumento de la placa existente. Esto apoya la hipótesis de que el triclosán puede ser adsorbido a la superficie del diente y puede prevenir la adhesión bacteriana o inhibir el crecimiento de bacterias que colonizan la superficie.

Agentes químicos de tercera generación

Sustancias antibacterianas con poco efecto, pero que interfieren con la adhesión bacteriana son agentes denominados de tercera generación (aminoalcoholes: octapinol, decapinol). Se ha demostrado que el uso de estos elementos como suplementos a las medidas de higiene oral reducen la formación de la placa bacteriana en comparación con un enjuague bucal placebo. Sin embargo, desde el punto de vista clínico, los agentes antibacterianos de segunda generación siguen siendo de primera elección.

Antibióticos

Los antibióticos no están indicados para el control de la placa bacteriana. Sus potenciales efectos adversos exceden su posible valor terapéutico y no son eficaces en el control de la placa supragingival y en el tratamiento de gingivitis.

Dispositivos de irrigación

El uso de dispositivos de irrigación puede aumentar la capacidad de los productos para llegar a la zona subgingival. Sin embargo, varios estudios han concluido que en general la irrigación en el margen gingival no es muy eficiente en lograr una profundidad suficientemente apical con respecto a la placa subgingival, incluso cuando la punta del irrigador se coloca 3 mm en el interior del bolsillo. Actualmente, se han diseñado aparatos de irrigación oral eléctricos y mecánicos, que tienen una baja previsibilidad en alcanzar la profundidad completa de la hendidura gingival, tanto en sitios de poca como en los de mayor profundidad.

La eficacia de la irrigación subgingival está limitada por la acción del fluido crevicular causando un rápido aclaramiento de irrigante, por la presencia de componentes de la sangre que inactivan la solución, y por la presencia de cálculo subgingival que impide la penetración del agente.

Desde el punto de vista microbiológico, la irrigación subgingival por sí mismo puede alterar temporalmente la composición bacteriana. Sin embargo, dentro de las primeras ocho semanas hay una recurrencia completa de los niveles originales de bacterias subgingivales. La posible reducción de espiroquetas y *Bacillus* móviles después de una irrigación profesional se puede atribuir a la

frecuente rotura mecánica más que el efecto del agente utilizado por sí mismo. Del mismo modo, estos cambios microbiológicos no tienen ningún efecto sobre el sangrado, el nivel de inserción, profundidad de sondaje y no detienen la progresión de la enfermedad periodontal.

Los resultados clínicos (periodontitis) obtenidos con la instrumentación mecánica (alisado
5 radicular) no se superan cuando se asocia irrigación subgingival, independiente del agente químico usado. La única función es la de arrastre mecánico. Con la excepción de altas concentraciones de clorhexidina (2%) o tetraciclina (10%) y sólo cuando se aplica durante más de 5 minutos, la adición de agentes antimicrobianos en la solución de irrigación no añade ningún beneficio a la obtenida cuando se utiliza solamente agua o solución salina.

10 Durante la fase de mantenimiento de un paciente tratado, la irrigación diaria puede mejorar la higiene bucal y la salud gingival de pacientes con un bajo nivel de control mecánico de la placa. Sin embargo, esto no significa que las irrigaciones impidan la repoblación de la zona con las bacterias patógenas o modifica los tiempos de intervalos entre sesiones de mantenimiento. Por esta razón, la irrigación del surco no puede reemplazar la instrumentación mecánica profesional
15 durante el control de soporte periodontal.

Pastas de dientes

Las principales funciones de un dentífrico (además de cepillado) son: la reducción de la cantidad de la placa, reducir el riesgo de caries, quitar las manchas dentales, eliminar los restos de alimentos y mejorar el aliento. Los beneficios buscados son influenciados directamente por la acción del
20 agente principal y su relación con otros compuestos, ya sea de la misma formulación o de otras fuentes. Las pastas de dientes contienen una serie de compuestos que sirven para a los efectos anteriores:

- Agente abrasivo (debe limpiar y pulir, sin causar daños al esmalte, dentina y mucosas; debe ser insoluble, inerte, no tóxico y preferiblemente blanco; carbonato de calcio, alúmina,
25 sílice se utilizan en la actualidad, el tamaño, la forma y la dureza de la partícula es

importante).

- Relleno (proporciona estabilidad y consistencia; puede ser soluble o insoluble en agua; se utilizan alginatos, carboximetilcelulosa de sodio, de magnesio y sodio, y otros).
- Surfactante (participa en la dispersión de los restos de alimentos y otros; el más
5 ampliamente utilizado es lauril sulfato de sodio, que también tiene propiedades antibacterianas y ayuda a la solubilización de ingredientes claves, tales como saborizantes y determinados agentes antibacterianos).
- Humectante (ayuda a reducir la pérdida de humedad y mejora la textura del producto en la boca).
- 10 • Saborizantes.
- Agentes terapéuticos (anti-caries, anti-placa, para reducir la hipersensibilidad de la dentina y agentes blanqueadores).

En la actualidad existen formulaciones de pastas o geles que tienen como principal agente químico el triclosán o la clorhexidina. La eficacia de gel de clorhexidina depende de la capacidad del
15 paciente para lograr un control mecánico eficaz de la placa bacteriana, es decir, la capacidad del paciente para llevar el gel a los sitios apropiados de la boca. El gel de clorhexidina no penetra fácilmente en las zonas alejadas de la zona de aplicación, de esta manera, cierta eficacia del gel depende de la cantidad correcta que llegue en las áreas apropiadas de la boca y su estancia durante un largo período.

20 Hay geles con una concentración de 0,1% y 1% de clorhexidina. Teniendo en cuenta la dilución del agente por la acción de la saliva durante el cepillado, la concentración real de la clorhexidina por lo tanto es menor.

En conclusión, las medidas preventivas para mantener una salud periodontal y las acciones terapéuticas que se utilizan para tratar la gingivitis y la periodontitis se basan en la eliminación y
25 control de la placa.

El control más eficaz de la placa es la eliminación mecánica mediante la práctica de la técnica correcta de cepillado y uso de hilo dental y profilaxis profesional.

La combinación de productos químicos con la eliminación mecánica para la higiene bucal ofrece una ventaja debido a que la mayor concentración de la carga bacteriana puede reducirse mecánicamente, dejando un número de placa desorganizada y delgada que se puede quitar con productos químicos.

Para que la irrigación subgingival tome un papel importante en el tratamiento de la enfermedad periodontal, es necesario tener un efecto significativo y sostenido en la composición bacteriana, lograr un efecto positivo a largo plazo sobre los parámetros clínicos de la periodontitis y un efecto beneficioso más allá del efecto logrado con alisado radicular solo.

Existen varios productos para el manejo de la placa bacteriana, reducción en la formación de cálculos y para la hipersensibilidad de la dentina. La elección clínica de estos compuestos se debe basar en la validez científica y su relación con las necesidades reales del paciente.

Estatinas

Como una forma de disminuir los efectos adversos del control químico de las bacterias, es que se han enfocado actualmente los esfuerzos al uso de estatinas.

Las estatinas son medicamentos que han sido ampliamente utilizados para tratar la hipercolesterolemia en pacientes con alto riesgo de desarrollar aterosclerosis y tienen episodios de enfermedad cardiovascular. Las estatinas son potentes agentes reductores del colesterol, que inhiben la biosíntesis de éste en el hígado y en consecuencia han demostrado efectos beneficiosos en la prevención primaria y secundaria de la cardiopatía isquémica. Estos fármacos inhiben la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa) (Essig, M. *et al*, 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. *Circ. Res.* 1998;83:683-690), responsable de la conversión en el hígado de la HMG-CoA a ácido mevalónico, el precursor del colesterol, que resulta en una reducción de los

niveles de colesterol de baja densidad (LDL) y otros cambios en el perfil lipídico.

Basado en los antecedentes anteriormente descritos, en relación con los mecanismos inflamatorios implicados en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, hay un cierto paralelismo entre estos y los cambios inflamatorios responsables de la patogénesis de la enfermedad periodontal. Un creciente interés en el estudio de la relación potencial entre ambas enfermedades ha sido desarrollado en las últimas décadas, sugiriendo la existencia de mecanismos comunes subyacentes que unirían la salud periodontal y cardiovascular. Estudios *in vitro* y ensayos *in vivo* han sugerido el uso potencial de las estatinas en la enfermedad periodontal, incluso algunos pocos estudios retrospectivos muestran que los pacientes con periodontitis crónica avanzada tratados con estatinas mejoran su evolución. Por último, se ha descrito que las estatinas poseen también efectos en el aumento de la formación ósea, aumento de la angiogénesis y efectos bactericidas.

En el contexto del uso de estatinas en composiciones odontológicas, la patente US6300377 divulga una composición líquida que comprende Coenzima Q. La composición divulgada está destinada al tratamiento de la periodontitis y de trastornos relacionados con las encías. Esta composición puede estar formulada en enjuagues bucales, pasta de dientes o goma de mascar. Dentro de los componentes que puede comprender la composición se encuentran agentes gelificantes, agentes tensioactivos, triglicéridos, fosfolípidos. Además, se menciona que puede comprender opcionalmente un segundo agente activo que puede ser una estatina, tal como, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina, pravastatina, mevastatina, cerivastatina, en una concentración de entre 0,01% a 20% en relación al peso total de la composición.

La solicitud de patente WO2014030132 divulga el uso de una composición tópica que comprende atorvastatina en un rango entre 0,2% a 10% como único principio activo para la preparación de una composición útil para la prevención primaria o tratamiento de la enfermedad periodontal humana o animal.

La publicación “*the use of topical subgingival application of simvastatin gel in treatment of peri*

implant mucositis: A pilot study”, corresponde a una publicación acerca del tratamiento de la mucositis periimplantaría a través del uso tópico de simvastatina. La simvastatina está formulada en un gel con una concentración al 1,2%. Dentro del documento también se divulga el uso de antisépticos de forma oral para la mucositis periimplantaría, dentro de los que se encuentra clorhexidina en una dosis de 0,12% y 0,2%, el cual se aplica en forma de gel. Sin embargo, esta publicación no menciona el uso de esta composición para el tratamiento de la periodontitis.

Por último, la publicación de Kamińska *et al*, 2018: “*Effects of statins on multispecies oral biofilm identify simvastatin as a drug candidate targeting Porphyromonas gingivalis*” divulga una investigación sobre la actividad antimicrobiana de las estatinas contra las bacterias de la homeostasis periodontal causantes de la periodontitis crónica, tales como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tanerella forsythia*. Este estudio se investigó la efectividad de cuatro tipo de estatinas (atorvastatina, fluvastatina, lovastatina y simvastatina) sobre estas bacterias, lo que arrojó como resultado que la efectividad sólo se presenta en algunas de las bacterias estudiadas y que, además, dicha efectividad es muy dependiente de la concentración de cada una de las estatinas. Esto se demuestra cuando las estatinas atorvastatina y simvastatina no fueron capaces de producir ningún efecto bactericida. Por ejemplo, sobre *Fusobacterium nucleatum*, a pesar de su uso a altas concentraciones.

Como consecuencia, y a pesar de las investigaciones y esfuerzos que se han hecho para combatir la enfermedad periodontal, aún no ha sido posible encontrar una solución eficaz para esta enfermedad.

Un objetivo de la presente invención es proveer una alternativa que sea eficaz en el tratamiento y prevención de la gingivitis, periodontitis, especialmente la periodontitis crónica y agresiva.

En respuesta a esta necesidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de estatinas con agentes antisépticos y/o antibacterianos, en conjunto con agentes auxiliares facilitadores, los cuales producen un efecto antibacteriano

sinérgico para combatir distintas especies de bacterias asociadas a la aparición de la enfermedad periodontal crónica y agresiva. Esta composición sinérgica permite el uso de una amplia gama de estatinas y de distintos tipos, que muestran ser efectivas incluso a concentraciones muy bajas.

Este hallazgo sorprendente nos permite presentar una nueva terapia para el control de esta
5 patología, la cual apunta a tratar la infección bacteriana, que sería uno de los factores principales dentro de la etiología de la periodontitis.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una estatina en combinación con al menos un agente antiséptico y/o antibacteriano oxidante y al menos
10 un agente auxiliar facilitador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones según la presente invención se formulan, por ejemplo, pero no limitado a pasta de dientes, enjuague bucal, hilo dental, tabletas para disolver en la boca, elementos o dispositivos intraorales de liberación controlada, entre otros.

Estas composiciones tienen aplicación en el tratamiento de enfermedades de los tejidos blandos
15 presentes en la cavidad bucal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Fotografías de la progresión de la enfermedad periodontal.

Figura 2: Fotografías de placas con un césped de bacteria *Fusobacterium nucleatum* y
Composiciones 1, 2, 3 y 4.

20 Figura 3: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 1.

Figura 4: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 1.

Figura 5: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 1.

Figura 6: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 2.

Figura 7: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 2.

- Figura 8: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 2.
- Figura 9: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 3.
- Figura 10: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 3.
- Figura 11: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 3.
- 5 Figura 12: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 4.
- Figura 13: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 4.
- Figura 14: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 4.
- Figura 15: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 1.
- Figura 16: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 2.
- 10 Figura 17: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 3.
- Figura 18: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 4.
- Figura 19: Fotografías de placas con un césped de bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y las Composiciones 1, 2, 3 y 4.
- Figura 20: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 1.
- 15 Figura 21: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 1.
- Figura 22: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 1.
- Figura 23: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 2.
- Figura 24: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 2.
- Figura 25: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 2.
- 20 Figura 26: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 3.
- Figura 27: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 3.
- Figura 28: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 3.
- Figura 29: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 4.
- Figura 30: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 4.
- 25 Figura 31: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 4.

Figura 32: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 1.

Figura 33: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 2.

Figura 34: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 3.

Figura 35: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 4.

- 5 Figura 36: Fotografías de placas con un césped de bacteria *Fusobacterium nucleatum* y Composiciones 7, 8, 9, 10 y 11.

Figura 37: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 7.

Figura 38: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 7.

Figura 39: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 10.

- 10 Figura 40: Fotografías de placas con soluciones control y Composición 10.

Figura 41: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 7.

Figura 42: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 10.

Figura 43: Fotografías de placas con un césped de bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y las Composiciones 7, 8, 9, 10 y 11.

- 15 Figura 44: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 7.

Figura 45: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 7.

Figura 46: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 9.

Figura 47: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 9.

Figura 48: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 7.

- 20 Figura 49: Fotografía de diluciones seriadas y sus controles para la Composición 9.

Figura 50: Fotografías de placas con un césped de bacteria *Fusobacterium nucleatum* y Composiciones A, S, R y P.

Figura 51: Fotografías de placas con un césped de bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y las Composiciones A, S, R y P.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una estatina, al menos un agente antiséptico y/o antibacteriano con propiedades oxidantes y al menos un agente auxiliar facilitador farmacéuticamente aceptable. Asimismo, la presente invención se dirige al uso de la composición farmacéutica para prevenir y/o tratar enfermedades de los tejidos blandos y duros que rodean al diente, presentes en la cavidad bucal. Específicamente, para prevenir y/o tratar la enfermedad periodontal.

Las composiciones de la presente invención comprenden al menos una estatina seleccionada entre, pero no limitado a: lovastatina, rosuvastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina y pitavastatina o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Las composiciones de la presente invención también comprenden al menos un agente antiséptico y/o antibacteriano oxidante seleccionado entre, pero no limitado a: peróxido de hidrógeno, sales u oxisales que contiene cloro y/ bromo, tales como hipoclorito de sodio, clorito de sodio, entre otros.

Las composiciones de la presente invención también comprenden al menos un agente auxiliar facilitador farmacéuticamente aceptable seleccionado entre, pero no limitado a: al menos un aceite esencial, al menos un agente preservante derivado de fenol y al menos un agente humectante.

El agente auxiliar preservante o conservante de la presente invención se refiere a compuestos que ayudan a retrasar o prevenir el deterioro de la composición. Ejemplos de agentes preservantes fenólicos que pueden ser utilizados de acuerdo a la invención incluyen fenol, paraclorometaxilenol, paraclorofenol, cresol, hexilresorcinol, alquilparabenos como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isopropilparabeno e isobutilparabeno.

El agente auxiliar humectante de la presente invención tiene la capacidad de humectar la cavidad bucal y, además promover, estimular la salivación y prevenir su deshidratación, así como también para solubilizar ciertos principios activos. Ejemplos de humectantes de acuerdo a la invención incluyen xilitol, glicerina, sorbitol y glicoles, tales como propilenglicol y polietilenglicol y mezclas de los mismos.

El agente auxiliar facilitador de la presente invención también se selecciona de al menos un aceite esencial seleccionado de eugenol, alcanfor, timol (también referenciado como eucaliptol) y mentol, entre otros agentes ampliamente utilizados en odontología, los cuales poseen propiedades organolépticas que se mejoran la adherencia a la terapia por parte de los pacientes.

- 5 El pH de las composiciones orales de la invención se encuentra en el rango de 6,0 a 8,0, preferentemente entre 6,5 a 7,5. Por lo que de manera opcional las composiciones de la presente invención pueden comprender un agente auxiliar regulador del pH (tampones o buffers) los que se seleccionan entre bicarbonato, fosfato entre otros.

De manera opcional, al menos un extracto vegetal, y un saborizante, o combinaciones de los
10 mismos.

La composición de la invención también puede comprender otros agentes que pueden brindar beneficios al paciente, tales como antibióticos, sales de zinc y/o derivados de fluoruros.

Opcionalmente, la composición de la invención además comprende agentes saborizantes los cuales pueden seleccionarse de cualquier compuesto o mezcla de los mismos que permita realzar el sabor
15 de la composición. Saborizantes apropiados de acuerdo a la invención son ingredientes que provean una fragancia y/u otro efecto sensorial en la boca, tal como una sensación refrescante o de calidez. Dichos ingredientes incluyen, pero no se limitan a mentol, isoamilacetato, metil acetato, metilsalicilato, metilactato, alcanfor, aceite de eucalipto, eucaliptol, oxanona, esencia de naranja, esencia de guinda, aceite de menta, aceite de anís, anetol vainillina, papaya, etanol, entre otros.

20 La composición de la invención además puede comprender agentes edulcorantes. Estos agentes edulcorantes para uso en composiciones orales incluyen, por ejemplo, sacarina, dextrosa, sacarosa, sucralosa, stevia, alulosa, tagatosa, entre otros.

Las composiciones de la invención pueden ser preparadas mezclando cada uno de los ingredientes e incorporándolos en una cantidad apropiada de un excipiente, farmacéuticamente aceptable, tal
25 como un vehículo, disolvente entre otros.

Las composiciones de acuerdo a la invención además comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, el cual a la concentración empleada no causa ningún efecto no deseado en los sujetos a los que se les administra. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Se pueden seleccionar del grupo que consiste de
5 vehículos lipofílicos o hidrofílicos, diluyentes (tales como agua, alcohol, lactosa, maltosa y trehalosa), aglutinantes, agentes desintegrantes, agentes de mejora del flujo, agentes de ajuste del pH, agentes estabilizantes, agentes de ajuste de la viscosidad, conservadores, agentes gelificantes o hinchantes, agentes tensioactivos, agentes de suspensión. Tal como reconoce la persona experta, la elección específica de excipientes farmacéuticamente aceptables depende de la forma específica
10 o la formulación.

El experto en el arte comprenderá que el total de todos los ingredientes (componentes) utilizados en la composición de la invención suman 100% en peso del total de la composición. Además, a menos que se indique lo contrario, todos los porcentajes aquí descritos se refieren a porcentajes en peso del total de la composición.

15 En una realización preferida, las composiciones de la presente invención se encuentran formuladas de forma tópica u oral, por ejemplo, pero no limitado, como pasta de dientes, enjuague bucal, tabletas para disolver en la boca, elementos o dispositivos para intraoral e hilo dental.

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit farmacéutico que comprende la composición farmacéutica según se describió previamente junto con las correspondientes
20 instrucciones de uso.

En otra realización, las composiciones de la presente invención se usan en la prevención primaria y tratamiento de la enfermedad periodontal.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de tratamiento para prevenir y/o tratar enfermedades de los tejidos blandos presentes en la cavidad bucal,
25 específicamente, para prevenir y/o tratar la enfermedad periodontal, que comprende la

administración de las composiciones de la presente invención.

MODALIDADES PREFERIDAS DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a una composición farmacéutica oral que comprende al menos una estatina y al menos un agente antiséptico y/o antibacteriano.

- 5 En una modalidad de la invención la composición además comprende al menos un agente auxiliar facilitador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad preferente de la invención la composición el al menos un agente antiséptico y/o antibacteriano es un compuesto oxidante, el cual se selecciona peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, preferentemente peróxido de hidrógeno, el que está presente en una cantidad de al menos

- 10 0,0014% en peso respecto al total de la composición.

En otra modalidad de la invención el hipoclorito de sodio está presente en una cantidad de al menos 0,0023% en peso respecto al total de la composición.

En una modalidad de la invención la al menos una estatina es liposoluble, la cual se selecciona de lovastatina, simvastatina, atorvastatina y pitavastatina.

- 15 En otra modalidad de la invención la estatina es hidrosoluble, la cual se selecciona de pravastatina, fluvastatina y rosuvastatina.

En una modalidad preferida de la invención la estatina está presente en una cantidad de al menos 0,00029% en peso respecto al total de la composición.

- 20 En una modalidad de la invención el al menos un agente auxiliar facilitador es un preservante derivado de fenol, que se selecciona de fenol, paraclorofenol, alquilparabeno y mezcla de los mismos.

En una modalidad preferente de la invención el paraclorofenol está presente en una cantidad de al menos 0,00006% en peso respecto al total de la composición. En donde el paraclorofenol incluye un vehículo correspondiente a alcanfor en una cantidad de al menos 0,00009% en peso respecto al

- 25 total de la composición.

En otra modalidad de la invención el alquilparabeno se selecciona de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isopropilparabeno e isobutilparabeno, preferentemente metilparabeno, el que está presente en una cantidad de al menos 0,00071% en peso respecto al total de la composición.

- 5 En una modalidad de la invención el al menos un agente auxiliar facilitador es un aceite esencial, preferentemente eugenol, alcanfor o una mezcla de los mismos.

En una modalidad preferente de la invención el eugenol está presente en una cantidad de al menos 0,00014% en peso respecto al total de la composición.

- Aun en otra modalidad de la invención el al menos un agente auxiliar facilitador es un agente
10 humectante, preferentemente corresponde a xilitol, el cual está presente en una cantidad de al menos 0,04% en peso respecto al total de la composición.

En una modalidad de la invención el al menos un agente auxiliar facilitador es un diluyente, preferentemente agua purificada.

- En una modalidad de la invención la composición además comprende un regulador del pH
15 (tampón), preferentemente un tampón de bicarbonato.

En otra modalidad de la invención, la composición además comprende saborizantes, edulcorantes o una mezcla de los mismos.

- Además, la presente invención se dirige a una formulación farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la presente invención en donde dicha formulación se selecciona de
20 pasta de dientes, gel, enjuague bucal, hilo dental, tabletas para disolver en la boca y elementos o dispositivos intraorales de liberación controlada como cápsulas de micropartículas o nanopartículas.

- Adicionalmente, la presente invención se dirige al uso de la composición para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar enfermedades de los tejidos blandos y duros que rodean
25 al diente, presentes en la cavidad bucal. Preferentemente, la enfermedad de los tejidos blandos y

duros que rodean al diente se selecciona de gingivitis y periodontitis. Aun más preferentemente periodontitis crónica y periodontitis severa.

También la presente invención se dirige a un kit farmacéutico de uso ora que comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 1 e instrucciones de uso.

5 EJEMPLOS DE APLICACIÓN

EJEMPLO 1

La Tabla 1 muestra las diferentes composiciones preparadas representativas de la invención.

Tabla 1

Composición 1 (% en peso)	Composición 2 (% en peso)	Composición 3 (% en peso)	Composición 4 (% en peso)	Composición 5 (% en peso)	Composición 6 (% en peso)
Atorvastatina (0,02)	Simvastatina (0,02)	Rosuvastatina (0,02)	Pravastatina (0,02)	Pravastatina (0,02)	Rosuvastatina (0,1)
H ₂ O ₂ (0,1)	H ₂ O ₂ (0,1)	H ₂ O ₂ (0,1)	H ₂ O ₂ (0,1)	H ₂ O ₂ (0,1)	H ₂ O ₂ (0,1)
Paraclorofenol (0,004)	Paraclorofenol (0,004)	Paraclorofenol (0,004)	Paraclorofenol (0,004)	Metilparabeno (0,1)	Metilparabeno (0,05)
Eugenol (0,01)	Eugenol (0,01)	Eugenol (0,01)	Eugenol (0,01)	Eugenol (0,01)	Eugenol (0,01)
Xilitol (3,0)	Xilitol (3,0)	Xilitol (3,0)	Xilitol (3,0)	Xilitol (3,0)	Xilitol (3,0)
Alcanfor (0,006)	Alcanfor (0,006)	Alcanfor (0,006)	Alcanfor (0,006)	Alcanfor (0,006)	Alcanfor (0,006)

- 10 Adicionalmente, las composiciones de la Tabla 1 comprenden saborizantes, edulcorantes, un agente tampón, y agua purificada.

EJEMPLO 2

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las composiciones de la invención frente a bacterias asociadas a la Periodontitis crónica y a la Periodontitis agresiva se probaron 4 composiciones con

los ingredientes activos indicados en la Tabla 1 para las Composiciones 1 a 4, usando agua como diluyente hasta completar el 100% en peso, sobre las bacterias *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Se estudió la actividad inhibitoria de las composiciones mediante la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).

Metodología

Determinación de la Actividad Inhibitoria

Para realizar este estudio se utilizó el protocolo de difusión en disco estandarizado de KirbyBauer.

Para establecer si la composición posee actividad inhibitoria sobre las bacterias estudiadas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, se realizó la carga de sensidiscos con 5µL, 10µL y 20µL de cada composición, posterior a una incubación a temperatura ambiente por 8 h se probaron sobre un césped de la bacteria estudiada en medio TSVB incubando las placas durante 48 h a 37°C en capnofilia.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

En este estudio primero se debe determinar cuáles composiciones y/o compuestos presentan actividad inhibitoria y se realizan las siguientes diluciones de las composiciones descritas en la Tabla 1: 1/10, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100, 1/500, 1/1000 y 1/2000 en 2 ml de medio BHI líquido, en el cual se agrega una colonia aislada de la bacteria objetivo, y se deja incubar en capnofilia a 37°C por 24 h. Posteriormente, se realiza el recuento de muestras seleccionadas través de 8 diluciones seriadas (1:100) en una placa multipocillos, de cada dilución se siembran 5 µL en triplicado en una placa BHI y se incuban en anaerobiosis por 24 h.

Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

Este estudio se lleva a cabo realizando la siembra de una colonia aislada de la cepa en 8 tubos de ensayo con 2 ml de medio BHI líquido, estos tubos se incuban durante 24 h en capnofilia para luego agregar la composición o compuesto a evaluar en la razón 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000

y 1/2000, posterior a una nueva incubación de 24 h se realiza el recuento de muestras seleccionadas a través de 8 diluciones seriadas (1:100) en una placa multipocillos. De cada dilución se siembra 5 µL en triplicado en una placa BHI y se incuba en capnofilia por 24 h.

5 **Ensayo 2.1: Evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *Fusobacterium nucleatum***

El estudio preliminar de los compuestos se basó en determinar si los compuestos tienen actividad inhibitoria, por medio de esta experimentación se pudo establecer que las Composiciones 1, 2, 3 y 4 poseen actividad inhibitoria frente a *Fusobacterium nucleatum*.

En la Figura 2 se puede observar placas con un césped de la bacteria, sobre el cultivo se colocó un
10 sensidisco cargado previamente con 10 µL y 20 µL de cada composición.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Composición 1

Se prepararon diluciones seriadas desde 1/10 hasta 1/2000 con sus respectivos controles, con y sin bacterias. Un estudio preliminar la estableció la CIM dentro de las diluciones 1/50 y 1/10 (Figura
15 3).

El estudio posterior, situado en dicho rango de dilución preliminar mostró una variación del crecimiento entre 1/20 y 1/15, siendo en este último el crecimiento inexistente (Figura 4).

El recuento de las soluciones control y 1/20 (Figura 5) nos demostró que existe una clara disminución del crecimiento, se encontró un número de $9,43 \times 10^9$ UFC/mL y $2,86 \times 10^9$ UFC/mL
20 respectivamente, lo que establece un 69,9% de inhibición en la dilución 1/20 de la Composición 1.

Composición 2

Las diluciones seriadas de esta composición desde 1/10 hasta 1/2000 con sus respectivos controles con y sin bacterias, permitieron establecer la concentración mínima inhibitoria.

El estudio preliminar estableció la CMI dentro de las diluciones 1/50 y 1/10 (Figura 6), y el estudio posterior de diluciones dentro de dicho rango mostró una variación del crecimiento entre 1/20 y 1/15 (Figura 7), siendo en este último el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/20 (Figura 8) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, se encontró un número de $9,43 \times 10^9$ UFC/mL y $4,6 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente, lo que resulta en un 85,31% de inhibición en la dilución 1/20 de la Composición 2.

Composición 3

Las diluciones seriadas de esta composición desde 1/10 hasta 1/2000 con sus respectivos controles con y sin bacterias, y luego un segundo grupo de diluciones desde 1/5 hasta 1/25 con sus respectivos controles con y sin bacterias permitieron establecer la concentración mínima inhibitoria.

El estudio preliminar la estableció la CMI dentro de las diluciones 1/50 y 1/10 (Figura 9), y el estudio posterior de diluciones dentro de ese rango (Figura 10) mostró una variación del crecimiento entre 1/20 y 1/15, siendo en este último el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/20 (Figura 11) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, se encontró un número de $9,43 \times 10^9$ UFC/mL y $1,4 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente, lo que establece un 51,73% de inhibición en la dilución 1/20 de la Composición 3.

Composición 4

Las diluciones seriadas de esta composición desde 1/10 hasta 1/2000 con sus respectivos controles con y sin bacterias, y de un segundo grupo de diluciones desde 1/5 hasta 1/25 con sus respectivos controles con y sin bacterias, permitieron establecer la concentración mínima inhibitoria.

El ensayo preliminar estableció la CMI dentro de las diluciones 1/50 y 1/10 (Figura 12), y el estudio posterior de diluciones dentro de dicho rango (Figura 13) mostró una variación del crecimiento entre 1/20 y 1/15, siendo en este último el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/20 (Figura 14) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, se determinó un número de $9,43 \times 10^9$ UFC/mL y $3,4 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente, lo que establece un 64,33% de inhibición en la dilución 1/20 de la Composición 4.

5 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Composición 1

El recuento de las diluciones (Figura 15) mostró que en la dilución 1/10 de la Composición 1 las bacterias se encontraban muertas, estableciendo la CBM en la dilución 1/50. En el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la dilución 1/50 $13,6 \times 10^8$ UFC/mL, lo que estableció una acción bactericida del 91,82% en la dilución 1/50 de la Composición 1.

Composición 2

El recuento de las diluciones (Figura 16) estableció la CBM en la fracción 1/10, en el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la fracción 1/10 se encontraron $5,2 \times 10^9$ UFC/mL, lo que permitió establecer una acción bactericida del 88,2% en la dilución 1/10 de la Composición 2.

15 **Composición 3**

Las diluciones seriadas de la desde 1/10 a 1/2000 permitieron determinar la CBM por medio del recuento de las diluciones (Figura 17), estableciendo la CBM en la dilución 1/10, en el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la fracción 1/10 se encontraron $2,8 \times 10^9$ UFC/mL, lo que resulta en una acción bactericida del 36,4% en la dilución 1/10 de la Composición 3.

20 **Composición 4**

Las diluciones seriadas de la desde 1/10 a 1/2000 permitieron determinar la CBM por medio del recuento de las diluciones (Figura 18) mostró que en la disolución 1/10 las bacterias se encontraban muertas, estableciendo la CBM en la fracción 1/50, en el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la fracción 1/50 $4,1 \times 10^8$ UFC/mL, lo que determinó una acción bactericida del 90,91% en la dilución 1/50 de la Composición 4.

Conclusiones

Las Composiciones 1, 2, 3 y 4 generaron un efecto inhibitorio sobre *Fusobacterium nucleatum*.

La Tabla 2 muestra la efectividad de las diluciones de cada una de las composiciones de la presente invención en la inhibición del crecimiento de *Fusobacterium nucleatum*.

5

Tabla 2

	% de inhibición
Composición 1 (Dilución 1/20)	69,9
Composición 2 (Dilución 1/20)	85,3
Composición 3 (Dilución 1/20)	51,7
Composición 4 (Dilución 1/20)	64,3

Para las composiciones 1, 2, 3 y 4 la dilución 1/10 logró un 100% de inhibición.

La Tabla 3 muestra la efectividad de las diluciones de cada una de las composiciones de la presente invención en la eliminación de *Fusobacterium nucleatum*.

10

Tabla 3

	% de eliminación
Composición 1 (Dilución 1/50)	91,8
Composición 2 (Dilución 1/10)	88,2
Composición 3 (Dilución 1/50)	36,4
Composición 4 (Dilución 1/50)	90,9

Para todas las composiciones de acuerdo a la presente invención la dilución 1/10 logró un 100% de eliminación de la bacteria *Fusobacterium nucleatum*.

Es interesante notar que en algunas composiciones se observa un mejor efecto bactericida que inhibitorio, por ejemplo, en la Composición 1 un factor de dilución de 20 permite un 69,9 % de inhibición de *Fusobacterium nucleatum*, mientras que una dilución mayor, FD 50, mostró un

15

91,8% de eliminación de la misma bacteria. Los inventores creen que la razón de dicho comportamiento se debe a que un componente bioactivo a concentraciones elevadas puede que se agregue (aglomere) y disminuya su actividad, y, por lo tanto, al diluirse aumenta su actividad porque se disgrega. En el ejemplo de la Composición 1 que contiene atorvastatina, dicha explicación es muy coherente puesto que dicha estatina tiene baja solubilidad en agua, por lo que al diluirse se logra una dispersión total en la solución final, alcanzando niveles mayores de actividad.

Ensayo 2.2: Evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

El estudio preliminar de los compuestos se basó en establecer si los compuestos tienen actividad inhibitoria. Mediante esta experimentación se pudo establecer que las composiciones 1, 2, 3 y 4 presentan actividad inhibitoria frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

En la Figura 19 se puede observar placas con un césped de la bacteria, sobre el cultivo se colocó un sensidisco cargado previamente con 10 µL y 20 µL de cada composición.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Composición 1

Las diluciones seriadas de esta Composición permitieron establecer la concentración mínima inhibitoria. El estudio preliminar estableció la CIM dentro de las diluciones 1/100 y 1/50 (Figura 20), y el estudio posterior de diluciones dentro de este rango (Figura 21) mostró crecimiento hasta la fracción 1/60, siendo en la fracción 1/50 de la Composición 1 el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/60 (Figura 22) demostró que existe una clara disminución del crecimiento; se encontró un número de $5,7 \times 10^9$ UFC/mL para el control y $5,46 \times 10^6$ UFC/mL para la dilución 1/60 de la Composición 1, lo que establece un 99,91% de inhibición en la dilución 1/60.

Composición 2

El estudio preliminar de las diluciones seriadas estableció la CMI dentro de las diluciones 1/100 y 1/50 (Figura 23), y el estudio posterior de diluciones dentro de dicho rango (Figura 24) mostró crecimiento hasta la fracción 1/70, siendo en la fracción 1/60 de la Composición 1 el crecimiento
5 inexistente.

El recuento de las soluciones control y la dilución 1/70 de la Composición 2 (Figura 25) mostró que existe una clara disminución del crecimiento, se encontró un número de $5,7 \times 10^9$ UFC/mL y $1,106 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente, lo que estableció un 80,6% de inhibición en la dilución 1/70 de la Composición 2.

10 Composición 3

El ensayo preliminar estableció la CMI dentro de las diluciones 1/100 y 1/50 (Figura 26), y el estudio posterior de diluciones dentro de dicho rango (Figura 27) mostró crecimiento hasta la fracción 1/60, siendo en la fracción 1/50 de la Composición 3 el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/60 (Figura 28) demostró que existe una clara disminución
15 del crecimiento bacteriano, encontrándose un número de $5,7 \times 10^9$ UFC/mL y $9,52 \times 10^8$ UFC/mL respectivamente, lo que mostró un 83,3% de inhibición en la dilución 1/60 de la Composición 3.

Composición 4

El ensayo preliminar estableció la CMI dentro de las diluciones 1/100 y 1/50 (Figura 29), y el estudio posterior de diluciones dentro de dicho rango (Figura 30) mostró crecimiento hasta la
20 fracción 1/60, siendo en la fracción 1/50 de la Composición 4 un crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/60 (Figura 31) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, se encontró un número de $5,7 \times 10^9$ UFC/mL y $9,8 \times 10^8$ UFC/mL respectivamente, lo que estableció un 82,81% de inhibición en la dilución 1/60.

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

25 Composición 1

Las diluciones seriadas desde 1/10 a 1/2000 permitieron establecer la CMB mediante el recuento de las disoluciones (Figura 32), estableciendo la CBM en la fracción 1/10, en el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la fracción 1/10 $5,12 \times 10^8$ UFC/mL, lo que establece una acción bactericida del 91,08% en la dilución 1/10.

5 Composición 2

Las diluciones seriadas de esta composición desde 1/10 a 1/2000 permitieron establecer la CMB mediante el recuento de las disoluciones (Figura 33), la cual se estableció en la fracción 1/10. En el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la fracción 1/10 $8,4 \times 10^8$ UFC/mL, lo que determinó una acción bactericida del 85,26% en la dilución 1/10 de la Composición 2.

10 Composición 3

Las diluciones seriadas de esta composición permitieron establecer la CBM mediante el recuento de las disoluciones (Figura 34), la cual se estableció en la fracción 1/10. En el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la fracción 1/10 $4,8 \times 10^8$ UFC/mL, lo que resultó en una acción bactericida del 91,57% en la dilución 1/10 de la Composición 3.

15 Composición 4

Se estableció en la fracción 1/10 la CMB por medio del recuento de las disoluciones (Figura 35). En el control se encontraron $4,4 \times 10^9$ UFC/mL y en la fracción 1/10 $7,86 \times 10^8$ UFC/mL, lo que resultó en una acción bactericida del 86,21% en la dilución 1/10 de la Composición 4.

Conclusiones

20 Las Composiciones 1, 2, 3 y 4 generaron un efecto inhibitorio sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

La Tabla 4 muestra la efectividad de las diluciones de cada una de las composiciones de la presente invención en la inhibición del crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 4

	% de inhibición
Composición 1 (Dilución 1/60)	99,1
Composición 2 (Dilución 1/70)	80,6
Composición 3 (Dilución 1/60)	83,3
Composición 4 (Dilución 1/60)	82,8

El 100% de inhibición se logró con la dilución 1/50 para las Composiciones 1, 3 y 4, y con la dilución 1/60 para la Composición 2.

- 5 La Tabla 5 resume la efectividad de las diluciones de cada una de las composiciones de la presente invención en la eliminación bacteriana de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 5

	% de eliminación
Composición 1 (Dilución 1/10)	91,1
Composición 2 (Dilución 1/10)	85,3
Composición 3 (Dilución 1/10)	91,6
Composición 4 (Dilución 1/10)	86,2

EJEMPLO 3

- 10 Para evaluar si existe un efecto sinérgico asociado al uso de las estatinas en combinación con el resto de los compuestos activos de las composiciones de acuerdo a la presente invención, se realizaron ensayos con las composiciones detalladas en la Tabla 6, las cuales no incorporan ningún tipo de estatina.

Tabla 6

Compuesto activo	Compos. 7 (% en peso)	Compos. 8 (% en peso)	Compos. 9 (% en peso)	Compos. 10 (% en peso)	Compos. 11 (% en peso)
Peróxido de hidrógeno	0,10	-	-	0,10	-
Eugenol	0,010	0,010	-	-	0,010
Paraclorofenol	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
Metilparabeno					0,05
Alcanfor	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Xilitol	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00

Excipiente utilizado: Agua en cantidad suficiente.

Ensayo 3.1: Evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *Fusobacterium nucleatum*

Para determinar la actividad antimicrobiana de las composiciones de la Tabla 6 frente a

- 5 *Fusobacterium nucleatum* se siguieron las metodologías descritas en el Ejemplo 2.

Resultados

Un estudio preliminar sobre las Composiciones 7, 8, 9, 10 y 11 permitió establecer cuál de ellas presentan alguna actividad inhibitoria. El resultado de este estudio se pudo establecer que sólo las Composiciones 5 y 8 presentan actividad inhibitoria frente a *Fusobacterium nucleatum*.

- 10 La Figura 36 muestra la prueba antimicrobiana de los compuestos sobre *Fusobacterium nucleatum*. Se puede observar placas con una cepa de la bacteria, sobre el cultivo se colocó un sensidisco cargado previamente con 10 µL y 20 µL de cada composición.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Composición 7

- 15 Las diluciones seriadas de la Composición 7 permitieron establecer la CMI a 1/1000 (Figura 37) mostrando una variación del crecimiento entre 1/1000 y 1/500, siendo en este último el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/1000 (Figura 38) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, encontrando un número de $8,4 \times 10^9$ UFC/mL y $4,1 \times 10^8$ UFC/mL respectivamente, lo que resulta en un 95,1% de inhibición para la dilución 1/1000 de la Composición 7.

5 Composición 10

La CMI se estableció en la dilución 1/1000 (Figura 39) mostrando una variación del crecimiento entre 1/1000 y 1/500, siendo en este último el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/1000 (Figura 40) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, encontrando un número de $8,4 \times 10^9$ UFC/mL y $3,6 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente, lo que permite establecer un 42,8% de inhibición en la dilución 1/1000 de la Composición 10.

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Composición 7

Las diluciones seriadas de esta composición desde 1/10 a 1/2000 permitieron establecer la concentración bactericida mínima (Figura 41), la turbiedad de las soluciones indicó que en ninguna dilución la bacteria se vio afectada.

Composición 10

Las diluciones seriadas de esta composición desde 1/10 a 1/2000 permitieron establecer la concentración bactericida mínima (Figura 42). La turbiedad de las soluciones indicó que en ninguna dilución la bacteria se ve afectada.

Conclusiones

Las Composiciones 7 y 10 no presentan un efecto inhibitorio relevante cuando la bacteria se encuentra en cultivo; por lo tanto, su desarrollo no se ve interrumpido por dicha composición. Por lo que se puede concluir que estas composiciones presentan un efecto momentáneo que no es sostenido en el tiempo.

Ensayo 3.2: Evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Se determinó la actividad antimicrobiana para cada una de las composiciones de la Tabla 6 frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, siguiendo las mismas metodologías descritas en

5 Ejemplo 2.

El estudio preliminar para todas las composiciones se basó en establecer si los compuestos tienen actividad inhibitoria. Mediante esta experimentación se pudo determinar que solamente las Composiciones 7 y 9 presentan actividad inhibitoria sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

10 En la Figura 43 se pueden observar placas con un césped de la bacteria, sobre el cultivo se colocó un sensidisco cargado previamente con 10 µL y 20 µL de cada composición.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Composición 7

El estudio preliminar la estableció la CIM dentro de las diluciones 1/500 y 1/100 (Figura 44), y el
15 estudio posterior de diluciones dentro de dicho rango mostró crecimiento hasta la fracción 1/200, siendo en la fracción 1/100 de la Composición 7 el crecimiento inexistente.

El recuento de las soluciones control y 1/200 (Figura 45) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, encontrando un número de $1,2 \times 10^{11}$ UFC/mL y $6,1 \times 10^9$ UFC/mL respectivamente, lo que resultó en un 94% de inhibición en la dilución 1/200 para la Composición

20 7.

Composición 9

El estudio de diluciones de la Composición 9 (Figura 46) mostró crecimiento hasta la fracción 1/2. El recuento de las soluciones control y 1/2 (Figura 47) demostró que existe una clara disminución del crecimiento, encontrándose un número de $1,2 \times 10^{11}$ UFC/mL y $5,8 \times 10^8$ UFC/mL

respectivamente, lo que permite establecer un 99,51% de inhibición en la dilución 1/2 de la Composición 9.

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Composición 7

- 5 Las diluciones seriadas de la composición 7 desde 1/10 a 1/2000 permitieron establecer la concentración bactericida mínima (Figura 48), la turbiedad de las soluciones indicó que en ninguna de las diluciones la bacteria se ve afectada.

Composición 9

- 10 Las diluciones de esta composición desde 1/10 a 1/2000 permitieron establecer la concentración bactericida mínima (Figura 49), la turbiedad de las soluciones nos indica que en ninguna dilución la bacteria se ve afectada.

- Las Composiciones 7 y 9 no presentan un efecto inhibitorio relevante cuando la bacteria se encuentra en cultivo; por tanto, su desarrollo no se ve interrumpido por dicha composición. Por lo que se puede concluir que estas composiciones presentan un efecto momentáneo que no es
15 sostenido en el tiempo.

EJEMPLO 4

Para determinar si las estatinas por sí solas a concentraciones tan bajas como 0,02% en peso poseen alguna actividad bactericida frente a bacterias que producen periodontitis (crónica y severa) se realizaron ensayos con las siguientes composiciones:

20

Tabla 7

Composición	Ingrediente Activo (% en peso)
A	Atorvastatina (0,02)
S	Simvastatina (0,02)
R	Rosuvastatina (0,02)
P	Pravastatina (0,02)

Ensayo 4.1: Actividad antimicrobiana sobre *Fusobacterium nucleatum*

El estudio preliminar se basó en establecer si las Composiciones A, S, R y P presentan actividad inhibitoria. Por medio de esta experimentación se pudo determinar que ninguna de estas

5 Composiciones posee actividad inhibitoria frente a *Fusobacterium nucleatum* (Figura 50).

En la Figura P es posible observar placas con una cepa de la bacteria, sobre el cultivo se colocó un sensidisco cargado previamente con 10 µL y 20 µL de cada composición.

Ensayo 4.2: Actividad antimicrobiana sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

El estudio preliminar empleando las Composiciones A, S, R y P permitió establecer si éstas tienen
10 actividad inhibitoria a las concentraciones señaladas en la Tabla 7.

Se pudo determinar que ninguno de las Composiciones A, S, R y P presentan actividad inhibitoria frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Figura 51).

Se pueden observar placas con un césped de la bacteria, sobre el cultivo se colocó un sensidisco cargado previamente con 10 µL y 20 µL de cada composición.

EJEMPLO 5

Para determinar si las estatinas en conjunto con los agentes auxiliares poseen alguna actividad bactericida frente a bacterias que producen periodontitis (crónica y severa).

La Tabla 8 muestra la composición usada.

20

Tabla 8

Composición 8	% en peso
Pravastatina	0,020
Eugenol	0,010
Metilparabeno	0,010
Xilitol	3,0

Ensayo 5.1: Actividad antimicrobiana sobre *Fusobacterium nucleatum*

El estudio preliminar se basó en establecer si la composición de la Tabla 8 presenta actividad inhibitoria. Por medio de esta experimentación se pudo determinar que no hubo actividad inhibitoria frente a *Fusobacterium nucleatum*.

5 Ensayo 5.2: Actividad antimicrobiana sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

El estudio preliminar empleando la composición de la Tabla 8 permitió establecer si ésta presenta actividad inhibitoria.

Los resultados arrojaron que en las concentraciones usadas no hubo actividad inhibitoria frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Figura 51).

10

CONCLUSIONES

A partir de los ensayos realizados se observa que las Composiciones 1, 2, 3 y 4 de acuerdo a la presente invención presentan actividad inhibitoria y bactericida sobre *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

15 En cuanto a las composiciones comparativas, las Composiciones 7, 8, 9 y 10, las cuales no contienen estatinas, no mostraron efecto bactericida sobre *Fusobacterium nucleatum* y tampoco sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las Composiciones A, S, R y P, las que sólo incluyen una estatina a una concentración de 0,02% en peso, no mostraron tener efecto inhibitorio
20 sobre las bacterias mencionadas anteriormente. En tanto que al incorporar a la Composición P los agentes auxiliares, pero no un antibacteriano oxidante como el peróxido de hidrógeno, tampoco se observó actividad frente a las bacterias estudiadas.

A partir de los estudios realizador resulta evidente apreciar que las composiciones de acuerdo a la presente invención presentan un efecto sinérgico de acción inhibitoria y bactericida frente a
25 bacterias involucradas en la periodontitis crónica y severa. Efecto sinérgico atribuible a la

combinación estatina-agente antibacteriano oxidante en conjunto con los agentes auxiliares que facilitan la acción de los compuestos activos.

En efecto, las composiciones que carecen de la presencia de estatinas (7, 8, 9 y 10), si bien en algunos resultados de los estudios realizados muestran actividad inhibitoria, no presentan un efecto de eliminación de las bacterias causantes de la periodontitis. Por otra parte, las formulaciones que sólo incluyen estatinas en una concentración de 0,02% en peso (A, S, R y P), no mostraron efecto alguno, ni inhibitorio ni bactericida, sobre las bacterias causantes de la periodontitis.

Sin estar limitado por la teoría, los inventores creen que el efecto sinérgico de las composiciones podría atribuirse a los distintos mecanismos de acción de cada componente de la composición que actuarían de forma sinérgica. A saber, el efecto oxidante y destructivo para bacterias anaerobias del peróxido de hidrógeno, permitiría aumentar y mejorar la capacidad de las estatinas para inhibir el crecimiento del biofilm bacteriano, a través de la interacción de grupos metilos o de anillos de ciclopropilos con residuos aminoacídicos, reduciendo la formación de biopelículas, en presencia del o los agentes facilitadores que contribuyen a la sinergia de los principios activos, haciendo que bacterias tan resistentes como *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, sean incapaces de resistir el ataque antibiótico de la composición de la invención. Este efecto queda demostrado cuando la composición de la invención resulta efectiva aún en bajas concentraciones de activos, sólo en presencia de el o los agentes facilitadores.

Los resultados obtenidos cobran real importancia, cuando se observa que es posible tener un efecto para el control y eliminación de bacterias tan agresivas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a concentraciones muy bajas de cada componente, lo cual proporciona una gran versatilidad a los formatos en los que se puedan encontrar estas composiciones.

La especificación precedente se proporciona solo para propósitos ilustrativos y no está destinada a describir todos los aspectos posibles de la presente invención. Mientras la invención se ha mostrado en el presente documento y se han descrito detalladamente con respecto a varias modalidades ejemplares, los expertos en la técnica apreciarán que cambios menores a la descripción y varias otras modificaciones, omisiones y adiciones se hacen sin partir del espíritu y el alcance de los mismos.