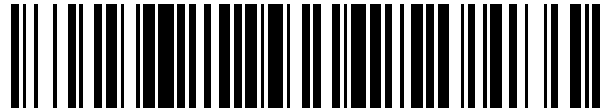


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 314**

51 Int. Cl.:

A61K 8/66 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2006 E 06801605 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **10.09.2008 EP 1965868**

54 Título: **Preparación sin peróxido para blanquear dientes naturales y fabricados**

30 Prioridad:

17.11.2005 US 281009

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

11.02.2013

73 Titular/es:

**TOM'S OF MAINE (100.0%)
302 LAFAYETTE CENTER
KENNEBUNK, ME 04043, US**

72 Inventor/es:

BERGERON, CHANTAL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 314 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparación sin peróxido para blanquear dientes naturales y fabricados.

Antecedentes

5 El blanqueamiento de los dientes (es decir, la eliminación de manchas de los dientes) es una industria de multibilloneros de dólares en el mundo entero. Se han intentado numerosas aproximaciones para blanquear los dientes, siendo las dos más comunes el uso de abrasivos, como tierra de diatomeas, sílice y bicarbonato sódico, o blanqueadores químicos, como peróxidos. Los abrasivos en combinación con una acción pulidora se usan para pulir descoloraciones y manchas de la superficie de los dientes. Así, la luz reflejada por los dientes representa el color intrínseco verdadero de los dientes. Los abrasivos son un elemento mayoritario de las pastas de dientes y pastas profilácticas para consumo más usadas por los dentistas. Ya que los abrasivos solo actúan en la superficie de los dientes, el color intrínseco del diente no cambia en gran parte. Así, los abrasivos solamente ofrecen una eficacia limitada en el blanqueamiento de los dientes y muchos abrasivos usados en formulaciones de la técnica anterior pueden dañar el esmalte de los dientes porque contienen o usan abrasivos fuertes no naturales.

15 La segunda aproximación es el uso de aditivos blanqueadores químicos en una composición para blanquear los dientes extrínsecamente e intrínsecamente. Los aditivos blanqueadores químicos se aplican sobre los dientes durante un periodo de tiempo para permitir actuar al ingrediente activo sobre el diente y proporcionar una mejora en la blancura de los dientes. Los blanqueadores se aplican comúnmente sobre los dientes usando pastas de dientes, enjuagues y lavados bucales, gomas, seda dental, comprimidos, tiras y cubetas. Un agente blanqueador químico común es peróxido. A menudo, se usan tiras y cubetas para aplicar el peróxido durante tiempos de contacto mayores que los llevados a cabo con un cepillado dental típico. La concentración del ingrediente activo blanqueador, el tiempo de contacto y el número de aplicaciones son algunos de los primeros parámetros que dictan la relación y cantidad de blanqueador realizadas con composiciones blanqueadoras de dientes a base de peróxido. Los productos blanqueadores que usan peróxidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. N^{os} 5 891 453 y 5 879 691 describen un producto blanqueador que comprende una composición de peróxido. Sin embargo, los peróxidos pueden causar irritación de los tejidos blandos (p.ej. gomas y otros tejidos orales) y algunas personas no pueden ponerse productos químicos fuertes en sus bocas. Además, ambas aproximaciones habitualmente disponibles para blanquear los dientes no son eficaces para el blanqueamiento de dientes fabricados. La patente de EE.UU. N^o 6 331 249 describe un dentífrico que contiene una composición de peróxido al igual que una proteasa, sin embargo, todavía adolece del mismo problema que las otras técnicas anteriores basadas en productos químicos que contienen peróxidos potencialmente dañinos al igual que otros productos químicos fuertes.

Por lo tanto, lo que se necesitan son composiciones y métodos para el blanqueamiento de ambos dientes naturales y fabricados que no utilicen productos químicos abrasivos fuertes o basados en peróxidos.

El documento US-B1-6 331 291 describe composiciones gel/pasta dentífricas.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona un método libre de peróxido de acuerdo con la reivindicación 1 para el blanqueamiento de dientes naturales y fabricados, y un producto libre de peróxido de acuerdo con la reivindicación 6. Las características preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

40 La presente invención se refiere a métodos para el blanqueamiento de dientes naturales y fabricados sin el uso de peróxidos o abrasivos. El ingrediente activo de la presente invención es "actinidina" (cruda, parcialmente purificada o purificada) y se produce a partir de kiwi. La presente invención proporciona métodos que usan actinidina como un agente blanqueador de los dientes en, por ejemplo, una tira, cubeta, dentífrico (p.ej. pastas de dientes o polvos dentales), limpiador de dentaduras, enjuague bucal, lavados bucales o chicle.

Descripción de las figuras

45 La Figura 1 muestra el efecto del porcentaje de glicerina sobre el cambio de color de los discos de hidroxiapatita tratados con una disolución al 5% de actinidina cruda coloreados con té y café.

La Figura 2 muestra el efecto del tiempo sobre el cambio de color de los discos de hidroxiapatita tratados con una disolución al 5% de actinidina cruda coloreados con té y café.

La Figura 3 muestra el mapa de dilución del ensayo de hidrólisis de caseína.

La Figura 4 muestra el mapa del ensayo final del ensayo de hidrólisis de caseína.

50 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una composición oral no abrasiva o abrasiva natural para blanquear dientes naturales, coronas y otros dientes fabricados, sin la presencia de peróxido o abrasivos, para restaurar el color natural de los dientes. Más específicamente, la invención se refiere al uso de un ingrediente botánico (actinidina

- cruda o purificada) como agente blanqueador en una tira o cubeta (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N^{os} 6 949 240, 6 514 483 y 5 702 251 al igual que las patentes de EE.UU. citadas en este texto), dentífrico (p.ej. pasta de dientes, agente limpiador de dentaduras o dentífricos en polvo, véanse, por ejemplo las patentes de EE.UU. N^{os} 6 861 048: 6 555 094, al igual que las patentes de EE.UU. citadas en este texto), enjuague y lavados bucales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N^o 6 004 538, al igual que las patentes de EE.UU. citadas en este texto), o chicles (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N^{os} 6 926 616, 6 416 774 y 4 146 634, al igual que las patentes de EE.UU. citadas en este texto), siendo todas sus fabricaciones conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, se añade glicerina a la composición de actinidina en el intervalo de 5% a 100% del total de la composición. Se describen realizaciones específicas de la invención en mayor detalle a continuación.
- El ingrediente botánico se refiere alternativamente como “actinidina cruda” o “preparación que contiene actinidina” y se produce a partir del kiwi. El trabajo experimental ha demostrado la eficacia de formulaciones de actinidina sustancialmente pura en el blanqueamiento de los dientes, al igual que la eficacia de formulaciones de una preparación de actinidina cruda que tiene una actividad específica de actinidina mínima definida. El procedimiento de producción usado para generar la actinidina cruda retira la piel y semillas de la pulpa del kiwi sin usar productos químicos, por ejemplo, y el producto crudo puede luego liofilizarse para su almacenamiento. La actinidina (EC 3.4.22.14), también conocida como actinidaina, es una proteasa del kiwi. La actinidina cruda tiene una actividad mínima de aproximadamente 3500 U/g (unidades por gramo) y una actividad típica de aproximadamente 5000 U/g estimado por un método de ensayo de hidrólisis de caseína tal como se describe en detalle en la sección experimental de esta especificación.
- Tal como se describe en este texto, “actinidina purificada” o “actinidina parcialmente purificada” es actinidina sustancialmente purificada a partir de actinidina cruda mediante procedimientos de purificación de proteínas conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989 y Protein Purification Protocols, 2nd Ed., ed., Culter, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harlow, UK, 2003). La actinidina purificada o parcialmente purificada tiene una actividad ensayada mediante un método de ensayo por hidrólisis de caseína (tal como se describe en la sección experimental de esta especificación) en el intervalo de 20000 U/g a 100000 U/g. Las técnicas de purificación de proteínas conocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, la precipitación de proteínas (con, por ejemplo, sales o polímeros), cromatografía de inmuno-afinidad, cromatografía de afinidad, intercambios y difusión con tampones (para retirar, por ejemplo, impurezas iónicas), cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración, microfiltración, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, etc. En una realización de la presente invención, la actinidina purificada es al menos 50% pura. En una realización más preferida, la actinidina purificada es al menos 70% pura. En una realización incluso más preferida, la actinidina purificada es al menos 90% pura. Todos los métodos y composiciones de la presente invención son compatibles con ambas actinidinas cruda y purificada.
- Las preparaciones que contienen actinidina purificada, parcialmente purificada o cruda se formulan para su aplicación sobre dientes naturales o fabricados en un intervalo de concentración de 50 a 1200 U/g. En una realización más preferida, la actinidina cruda se usa en composiciones de la presente invención en un intervalo de concentración de aproximadamente 100 a 1000 U/g determinado mediante el ensayo de hidrólisis de caseína (tal como se describe en la sección experimental). La preparación de actinidina cruda descrita anteriormente, que se prepara al retirar la piel y semillas, seguido de liofilización, se usa en las composiciones de la presente invención en un intervalo de concentración de aproximadamente 1 a 12% en peso de la composición final. En una realización más preferida, la actinidina cruda se usa en un intervalo de concentración de aproximadamente 2 a 10% en peso de la composición final. Si se usa actinidina purificada (o parcialmente purificada), se usa en la misma concentración final que se mide por U/g como en la actinidina cruda.
- La preparación que contiene actinidina, cuando se formula para su aplicación sobre dientes naturales o fabricados, es eficaz para la eliminación de manchas sobre la superficie del diente (manchas extrínsecas) y por debajo de la superficie del diente (manchas intrínsecas) causadas por alimentos que contienen polifenol como el té, café, arándano o vino y puede usarse en una composición oral para blanquear y restaurar el color natural de los dientes naturales y fabricados. En la aplicación inmediata “dientes fabricados” (o “diente fabricado”) se refiere a dentaduras, coronas, puentes, parciales o cualquier otro accesorio dental designado para reemplazar bien totalmente o parcialmente un diente o dientes naturales. El ingrediente activo de la presente invención también previene futuras manchas ya que reduce la formación de capas formadas por proteínas de la saliva (es decir, película), a las cuales se adhieren los agentes causantes de las manchas y mancha. A este respecto, la preparación que contiene actinidina es una antiadherente que puede prevenir la formación de placa y prevenir también que las manchas se adhieran a la placa, sarro, o película.
- La actinidina es una cisteína proteínasa del género Actinidia (kiwi o también referido como grosella china). La actinidina contiene un grupo sulfhidrilo libre, que es esencial para la actividad, y está agrupado, además, en la clase de tiol proteasas de plantas. Este grupo incluye también papaína de papaya, ficina de higos y bromelaina de piña. Las cisteína proteasas pueden romper las proteínas. En la técnica anterior, la actinidina se usa bien como enzima digestiva (tal como se discute en el siguiente párrafo) o ablandador de carne de alta calidad (King, et al., Meat Science, 5:389-396, 1981; Lewis, et al., J. Food Biochem, 12:147-158, 1988; Wada, et al., Food Chemistry, 78:167-171, 2002; Kowlessur, et al., Biochem. J, 259:443-452, 1989). Otras proteasas dentro de la familia de la papaína se

usan como acondicionadores en pasta, agentes antiinflamatorios o en la industria cervecera para prevenir la "turbidez" por almacenamiento.

El kiwi es conocido en el mundo entero como una fruta de pulpa verde. El kiwi crece comercialmente en Nueva Zelanda, Chile, California y otras áreas geográficas para un amplio espectro de aplicaciones desde zumos y concentrados a producción de vino. El kiwi es la fruta densa con más nutrientes en el mundo (Lachance, J Am Coll Nutr, 16:5, 1997) que contiene el doble de vitamina C que una naranja, potasio que un plátano, altos contenidos en vitamina E, carotenoides, ácidos fólicos, manganeso, y fibras solubles e insolubles y es bajo en sodio. El kiwi es también reconocido por sus enzimas, que son eficaces reguladores digestivos. La actinidina, que es la enzima predominante del kiwi, suma el 60% del total de proteína soluble en la pulpa del kiwi (incluido piel y semillas) se usa como un remedio para la indigestión natural. A diferencia de los remedios para la indigestión más convencionales la actinidina inicia la actividad de la enzima del estómago antes que alterar el pH.

Algunas cisteína proteasas se usan en preparaciones de cuidado oral, como papaína como un agente anti manchas en ciertas pastas dentales sola o en combinación con otros agentes, y bromelaina como agente anti-inflamatorio en ausencia de peróxido de hidrógeno. La actinidina (cruda o purificada) no se conoce por su uso como agente blanqueador para dientes naturales y fabricados.

Algunos individuos resultan ser más susceptibles al manchado extrínseco de los dientes que otros, pero las razones para tales diferencias no son claras (Watts and Addy, Food Chemistry 78:167-171, 2001). Las manchas extrínsecas se adsorben sobre los depósitos superficiales del diente como placa o la película adquirida. La película es una capa clara delgada de proteína a la cual se unen comida, bacterias y manchas. La película se forma cuando proteínas específicas de la saliva se unen a los dientes e hidroxiapatita, el principal componente mineral de los dientes (Nathoo, J Am Dent Assoc 128:6S-10S, 1997). La saliva contiene una alta proporción (hasta 70%; Kauffman and Keller, Arch Oral Biol., 24:249-256, 1979) de proteínas ricas en prolina, que forman la película. Las proteínas ricas en prolina de la película, particularmente las proteínas ricas en prolina básica, tienen particularmente una alta afinidad por los polifenoles de la alimentación que se cree que son al menos parcialmente responsables del manchado dental (Hagerman and Butler, J Biol Chem, 256:494-4497, 1981; Proctor, et al., J Dental Research, 84:73-78, 2005).

Los posibles agentes etiológicos para las manchas extrínsecas incluyen los componentes alimenticios, bebidas, tabaco, enjuagues bucales y otros medicamentos al igual que la higiene oral (Watts and Addy, Food Chemistry 78:167-171, 2001). Se piensa que el té, café vino tinto, y otros alimentos ricos en polifenoles son responsables del manchado alimenticio de los dientes. Los polifenoles son un grupo diverso de sustancias comúnmente encontradas en plantas. Van desde pequeños flavonoides, como catequinas del té verde y antocianinas de la piel de la uva, hasta estructuras altamente polimerizadas que contienen más de 50 moléculas de flavanol, como las teflavinas y terubiginas del té negro (Bravo, Nutrit Rev, 56:317-333, 1999; Bennick, Crit Rev Oral Biol Med, 13:184-196, 2002). Los componentes del té y del vino tinto han mostrado tener un profundo efecto sobre la maduración de la película *in vitro*, causando capas gruesas de material manchado que se acumulará, que no se retiran rápidamente (Joiner, et al., Eur J Oral Sci., 111:417-22, 2003). Las bacterias y manchas se unen a la película de proteína para formar la placa. Aunque la presente invención no está limitada por ningún mecanismo particular, se piensa que la inclusión de un extracto de kiwi que contiene proteasa en una composición oral, contribuye a la rotura de la película de proteína sin abrasión ni peróxidos retirando así las manchas y blanqueando los dientes.

Las manchas intrínsecas son manchas que se encuentran debajo de la superficie del diente. Los agentes que causan estas manchas bien se alojan en los poros del diente, se unen a minerales en el diente o se unen a las proteínas de la saliva que se ha alojado debajo de la superficie del diente. Las composiciones y métodos de la presente invención son también eficaces en la reducción y eliminación de manchas intrínsecas proporcionando de este modo incluso mayor blanqueamiento de ambos dientes naturales y fabricados que los agentes de la técnica anterior (p.ej., abrasivos) que solamente son activos contra manchas extrínsecas.

Lo que sigue es una descripción que se refiere a las realizaciones específicas de la presente invención.

Tiras blanqueadoras

La fabricación de tiras blanqueadoras y cubetas blanqueadoras son bien conocidos en la técnica. Brevemente, por ejemplo, las tiras blanqueadoras pueden fabricarse como sigue. La tira puede ser una película hidratable con agua fabricada por ejemplo, de películas de óxido de poli(etileno) de un espesor de aproximadamente 20 a aproximadamente 1500 micrómetros (μm) y preferentemente aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 μm . La película seca contiene el agente blanqueador actinidina en un estado inactivo. La hidratación de la película mediante la saliva en la cavidad oral solubiliza el agente blanqueador soluble en agua incorporado en la matriz de polímero de óxido de etileno del ejemplo mediante lo cual el agente blanqueador se activa y se libera sobre las superficies del diente sobre las cuales se ha aplicado la película. En otra realización, la película se prehidrata y el agente blanqueador basado en actinidina es una forma hidratada. Para tiras secas, la proporción a la cual el agente blanqueador se disuelve y posteriormente se libera en contacto con las superficies del diente se controla al variar el espesor de la película, las propiedades del polímero, al igual que la concentración del agente blanqueador, variando

generalmente la concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30% en peso y preferentemente aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25% en peso de la película.

Los polímeros de óxido de etileno útiles para los propósitos de la presente invención incluyen homopolímeros o mezclas de polímeros de óxido de etileno de variado peso molecular que van de aproximadamente 10000 Daltons y hasta aproximadamente 1000000 Daltons y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 100000 a aproximadamente 1500000 Daltons. Tales polímeros de óxido de etileno están comercialmente disponibles de varias fuentes. El poli(óxido de etileno) en el intervalo de peso molecular de 10000 a 1000000 Daltons está disponible en Union Carbide Company bajo la marca "Polyox" y son preferidos para los propósitos de la presente invención. El polímero de óxido de etileno comprende aproximadamente 50 a aproximadamente 95% en peso de la película de la presente invención y preferentemente aproximadamente 60 a aproximadamente 85% en peso.

El plastificante útil para los propósitos de la presente invención se elijen entre glicoles como propilenglicol, polietilenglicol, alcoholes polhídricos como glicerina y sorbitol y ésteres de glicerol como triacetato de glicerol. El plastificante contiene 5 a 30% en peso de la película de la presente invención y preferentemente aproximadamente 10 a aproximadamente 25% en peso.

La glicerina es el plastificante preferido para uso en la presente invención al igual que propilenglicol o polietilenglicol que está disponible en Union Carbide Company en sus series Carbowaxes, cuyo rango de peso molecular es 200 a 600 Daltons.

Además de la incorporación de agentes blanqueadores basados en actinidina y plastificante también puede incluirse en la matriz de la película o cantidades menores de agente blanqueador, p.ej., 0.01 a 2% en peso de otros ingredientes naturales como antioxidantes, preservativos, agentes reguladores del pH, agentes insensibilizantes, agentes estabilizantes, agentes gelificantes, aromas, etc. Un agente gelificante preferido es carragenano. Los agentes espesantes preferidos son arcilla hectorita, propilenglicol y glicerina. Los aromas preferidos son aromas naturales como menta, hierbabuena, albaricoque y canela, etc. Para dientes sensibles, la formulación puede contener un agente para aliviar el dolor en la gente con dientes sensibles. Un ingrediente preferido para este propósito es nitrato de potasio. Los agentes pueden añadirse para promover una sensación en la boca deseada. Un ingrediente preferido para esto es propóleo. Los agentes limpiadores pueden usarse en la presente invención. Un agente de limpieza preferido es sulfato de laurilo de sodio. Los agentes que retienen la humedad pueden usarse en las presentes formulaciones. Los agentes preferidos que retienen la humedad son sorbitol y xilitol.

Un lado de la película de polímero de óxido de etileno puede también recubrirse con una capa de recubrimiento protector delgada, p.ej. de 10 nanómetros (nm) a 500 micrómetros (μ) de espesor que sirve como una barrera para prevenir la liberación del agente blanqueador solubilizado de la matriz a la mucosa oral, consiguiendo así la liberación unidireccional del agente blanqueador únicamente sobre las superficies del diente.

El material de recubrimiento se aplica en una capa suficientemente delgada como para no interferir con la flexibilidad de la película y permitir a la tira blanqueadora ajustarse a una disposición de una fila de dientes.

Los materiales de recubrimiento pueden ser una combinación de alto peso molecular (esto es, pesos moleculares mayores de 1 000 000 Daltons) e incluye, por ejemplo, etil-celulosa, propil-celulosa, isopropil-celulosa, butil-celulosa, t-butil-celulosa, acetato de celulosa, y derivados de poli(alcohol vinílico) como poli(acetato de vinilo) y laca.

La película de polímero de óxido de etileno de la presente invención puede prepararse usando la extrusión convencional o procedimientos de moldeado por evaporación del disolvente. Por ejemplo, para preparar una película de poli(óxido de etileno) mediante evaporación de disolvente el polímero de óxido de etileno o mezcla de polímeros se disuelve en una cantidad suficiente de un disolvente que es compatible con el polímero. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen agua, alcoholes, acetona, acetato de etilo o sus mezclas. Después de formarse una disolución, se añade un plastificante con agitación, y se aplica calor si es necesario para ayudar a la disolución, hasta que se forma una solución clara y homogénea, seguido de la adición del agente blanqueador y cualquier otro ingrediente como aromas. La solución recubre un material soporte adecuado y se seca para formar una película. El material soporte debe tener una tensión superficial, que permite vaporizar la solución del polímero regularmente sobre el ancho del soporte deseado sin empapar para formar un enlace destructivo entre los dos sustratos. Los ejemplos de materiales soporte adecuados incluyen vidrio, acero inoxidable, teflón, papel kraft impregnado de polietileno.

La película usada en la invención inmediata puede contener una cera pero preferentemente no contiene una cera, etilen-tereftalato y/o poli(tereftalato de etileno), polietileno, TeflonTM, acetato de etilvinilo, alcohol de etilvinilo, poliésteres, hidroxipropil-celulosa, poliestireno, poliuretano, y/o un agente antimicrobiano.

El secado de la película, si se desea, puede llevarse a cabo en un baño de aire a alta temperatura usando un horno de secado, túnel de secado, secador a vacío, o cualquier otro equipo de secado adecuado, que no afecte adversamente el ingrediente(s) activo(s) o aroma de la película.

Para facilitar el uso, la película seca se corta en piezas de tamaño y forma adecuados y se guardan en un contenedor adecuado.

Para usar la tira de película blanqueadora de la presente invención, la película cuando se aplica sobre la superficie de los dientes cuando se hidrata con saliva, si es necesario, en la cavidad oral o humedecida previamente al sumergir la tira en agua, se adherirá a los dientes de una manera apropiada. A este respecto, la tira blanqueadora se forma para tener una dimensión de anchura adecuada para cubrir una fila de dientes (superior o inferior). Además, la tira blanqueadora puede aplicarse sobre los dientes superiores, o los dientes inferiores bien separadamente o simultáneamente. La dimensión de la longitud de la tira blanqueadora se determina por la cantidad de recubrimiento deseado. A este respecto, el número de dientes, que se desea blanquear determinará las dimensiones de la tira blanqueadora. Por ejemplo, se puede desear blanquear solamente los dientes frontales, que son los que se ven más fácilmente que otros. De acuerdo con esto, la longitud de la tira blanqueadora puede reducirse en este caso, si se compara con el caso en el que se desea blanquear todos los dientes. La duración de la aplicación de la tira blanqueadora sobre los dientes dependerá del tipo y concentración del agente blanqueador, al igual que el tipo e intensidad de la mancha.

En otra realización, la tira de material puede formarse a partir de materiales como polímeros, tejidos naturales y sintéticos, non-tejidos, papel de aluminio, papel, goma, y sus combinaciones. La tira puede comprender también un soporte antiadherente. La tira de material (al igual que el soporte antiadherente) puede ser una capa sencilla de material o un laminado de más de una capa. Los polímeros adecuados incluyen, sin ser limitantes, acetato de etilvinilo, alcohol de etilvinilo, poliésteres como MYLAR® fabricado por DuPont, y sus combinaciones.

El soporte antiadherente puede formarse a partir de cualquier material que exhiba menos afinidad por la composición blanqueadora de dientes que la composición blanqueadora de dientes exhibe por sí misma y por la tira de material. Por ejemplo, el soporte antiadherente puede formarse con un papel o un poliéster, como SCOTCHPAK® que fabrica 3M Corp. de Minneapolis, Minn., que están recubiertos con un material antiadherente con el fin de ayudar a la liberación de la composición blanqueadora de dientes a partir del soporte antiadherente cuando la tira de material es retirada del soporte antiadherente. Los recubrimientos ejemplares pueden incluir cera, silicona, fluoropolímeros como Teflon®, fluorosiliconas, u otros materiales de tipo antiadherente. También, los recubrimientos adecuados pueden incluir uno de los recubrimientos descritos en la patente de EE.UU. N^{os} 3 810 874; 4 472 480; 4 567 073; 4 614 667; 4 830 910; y 5 306 758. Se encuentra una mayor descripción de materiales adecuados que pueden ser adecuados como agentes de liberación en Kirck-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Cuarta Edición, Volumen 21, pp. 207-218, incorporado en este texto como referencia. El soporte antiadherente podría ser al menos del mismo tamaño y forma que la tira blanqueadora. Sin embargo, el soporte antiadherente puede extenderse por debajo de la tira de material de modo que sea más fácil retirar la tira de material y la capa delgada del agente blanqueador a base de actinidina del soporte antiadherente.

Mientras la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina se describe en este texto que comprende, por ejemplo, ambas tira de material y el soporte antiadherente, se contempla que la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina pueda comprender solamente la tira de material y la capa delgada de la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina. Por ejemplo, el interior de un envoltorio que almacena la tira de material y la capa delgada de la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina puede recubrirse de una manera similar a la descrita anteriormente con respecto al soporte antiadherente para facilitar la retirada de la tira de material y la capa delgada de la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina del envoltorio durante el uso. Además, se contempla que la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina puede proveerse en forma de un rollo mejor que plano tal como se ha descrito anteriormente y podría comprender una pluralidad de tira de materiales y/o soportes antiadherentes. Alternativamente, se contempla que la tira de material y/o soporte antiadherente puede incluir otras formas no planas como cubetas dentales preformadas o cubetas dentales flexibles. La tira de material y/o soporte antiadherente puede formarse también a partir de tiras deformables permanentemente de material, cera, o cualquier otro material adecuado para su uso como una barrera para la composición blanqueadora de dientes y para aplicar la composición blanqueadora de dientes sobre los dientes.

Mientras los materiales descritos anteriormente para la tira de material y soporte antiadherente son adecuados para uso con la presente invención, la estabilidad de la capa delgada de la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina puede mejorarse cuando el soporte antiadherente y/o tira de material (o al menos las superficies en contacto con la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina) se forman a partir de poliolefina y, preferentemente, a partir de polietileno o polipropileno. Incluso pequeños incrementos moderados en la estabilidad de la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina puede tener un impacto significativo en la vida del producto. Tal como se usa en este texto, el término "estabilidad" pretende referirse a la propensión de una composición blanqueadora de dientes a base de actinidina de mantener al menos el 90% de su concentración original o actividad sobre un periodo de tiempo especificado (p.ej. 3 meses, 6 meses, 12 meses), en el cual el periodo de tiempo especificado se mide empezando por el punto en el que la composición blanqueadora de dientes se fabrica y se forma como una capa delgada. Otras mezclas de poliolefina, mezclas de polietileno, mezclas de polipropileno, y sus combinaciones también serían adecuadas para uso como la tira de material y/o soporte antiadherente en la presente invención. Tal como se ha discutido anteriormente, el soporte antiadherente también puede recubrirse para ayudar a la liberación de la composición blanqueadora de dientes del soporte antiadherente durante su fabricación y/o su uso. Sin embargo, estos recubrimientos generalmente no actúan como barreras entre la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina y el material subyacente de modo que todavía es deseable la selección adecuada del material subyacente. Cualquier recubrimiento debería ser inerte, sin embargo, respecto de la composición blanqueadora de dientes a base de actinidina.

La tira de material y/o soporte antiadherente son generalmente menos de aproximadamente 1 mm de espesor, preferentemente menos de aproximadamente 0,05 mm de espesor, y más preferentemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,03 mm de espesor. Todavía más preferentemente, la tira de material y/o soporte antiadherente son menos de aproximadamente 0,1 mm de espesor y sin embargo más preferentemente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,02 mm de espesor. El espesor y la permeabilidad de la tira de material y/o soporte antiadherente pueden tener un efecto sobre la estabilidad de la composición blanqueadora de dientes. En general, una tira más gruesa puede proporcionar más estabilidad a la composición blanqueadora de dientes. Sin embargo, el espesor de la tira de material debe ajustarse a la aceptación del consumidor del confort al llevar la tira.

La tira de material debería tener una dureza a la flexión relativamente baja de modo que sea capaz de cubrir las superficies contorneadas de los dientes ejerciendo muy poca fuerza; esto es, conformidad con la curvatura de la boca de las personas que llevan dentadura, dientes, y espacios entre los dientes se mantiene ya que hay una pequeña fuerza residual entre la tira de material para causar que vuelva sustancialmente a su forma plana. La flexibilidad de la tira de material permite que esté en contacto con tejidos blandos cercanos durante un periodo de tiempo largo sin irritación física. La tira de material no requiere presión para formarse sobre los dientes y toma la forma rápidamente sobre las superficies del diente y los espacios intersticiales de los dientes sin deformación permanente cuando se aplica.

La dureza en la flexión es una propiedad del material que es una función de una combinación del espesor de la tira, anchura, y módulo de elasticidad del material. Este ensayo es un método para medir la rigidez de la película y lámina de poliolefina. Determina la resistencia a la flexión de una muestra al usar un patrón de mancha fijada sobre el final de una barra horizontal. El final opuesto de la barra presiona una tira de la muestra para forzar una porción de la tira en una ranura vertical en una plataforma horizontal sobre la cual se mantiene la muestra. Un microamperímetro, enrollado sobre el patrón de mancha se calibra en gramos de fuerza de deflexión. La rigidez de la muestra se lee directamente del microamperímetro y se expresa en gramos por centímetro de anchura de tira de muestra. En una realización preferida pero no requerida para la presente invención, la tira flexible de material tiene una dureza en la flexión de menos de aproximadamente 5 gramos/cm medidos en un Handle-O-Meter, modelo #211-300, disponible en Thwing-Albert Instrument Co. de Philadelphia, Pa. según el método de ensayo ASTM D2923-95. Preferentemente, la tira de material tiene una dureza a la flexión menor de aproximadamente 4 gramos/cm, más preferentemente menor de aproximadamente 3 gramos/cm, y más preferentemente de aproximadamente 0,1 gramos/cm a aproximadamente 1 gramo/cm.

Cubetas blanqueadoras

De manera similar a las tiras blanqueadoras, las cubetas blanqueadoras pueden usarse para contener la composición blanqueadora a base de actinidina de la presente invención cerca de los dientes.

Una cubeta formada de acuerdo con la presente invención puede usarse para aplicar la composición blanqueadora a base de actinidina sobre los dientes. La cubeta, por ejemplo, comprende generalmente una hendidura en forma de U configurada como arco, que tiene un piso y una pared exterior algo en forma de arco en ella integrada y una pared interior algo en forma de arco, también integrada en ella. Se puede apreciar que las dos paredes están separadas la una de la otra para formar un canal interior o ranura o también denominado "hendidura" de un tamaño para recibir los dientes del usuario.

La cubeta de la presente invención se forma preferentemente de cualquiera de un número de materiales plásticos que sean capaces de ser moldeados cuando se calientan. Un plástico vinílico es uno de los materiales preferidos ya que puede calentarse y volverse plegable y moldeable a una temperatura relativamente baja, aunque la invención claramente no está limitada al uso de plásticos vinílicos. Otros materiales plásticos, como copolímeros de estireno y similares, también podrían usarse.

La cubeta puede, pero no es necesario, proveerse en su superficie exterior con un asa para la participación del usuario. Esta asa está preferentemente integrada con la pared exterior y podría extenderse por fuera entre los labios del usuario cuando el arco esté dispuesto sobre los dientes del usuario.

El borde superior de la pared exterior puede estar festoneada, eso es, provisto de una porción del borde algo serpentina, como se muestra. En este sentido, la pared externa conformará más totalmente a la porción saliente de la boca existente entre los dientes y los labios del usuario.

También se sitúa un inserto en forma de arco en el canal y esencialmente tiene una forma de arco similar a la pared externa. Además, el inserto está ligeramente espaciado por dentro desde la superficie interior de la pared exterior de modo que forma un reservorio. En esta realización ejemplar de la invención, el inserto no se extiende por la distancia total de la pared exterior sino que se extiende alrededor de una porción sustancial del arco para abarcar particularmente aquellos dientes que son visibles durante una sonrisa o conversación del usuario.

El inserto, de manera extraíble, puede sostenerse en la posición para formar el reservorio por medio de lengüetas formadas a lo largo del borde inferior del inserto y que se alargan hasta topes o depresiones formadas en la

superficie interior de la pared exterior. Sin embargo, se puede usar cualquier medio para retener temporalmente el inserto en la posición en la cubeta.

5 En una realización, la cubeta se moldea a los dientes del usuario. Por ejemplo, con el fin de formar la cubeta y moldear eficazmente la misma para conformar la forma del arco y dientes del usuario, el plástico que forma la cubeta, y el soporte se calientan de modo que se vuelva algo flexible y plegable, esto es eficazmente moldeable. El calentamiento puede llevarse a cabo de muy diversas maneras. Una manera típicamente conveniente es insertar la cubeta en un baño de agua caliente. La cubeta puede sumergirse simplemente en el agua sujetando el extremo exterior del asa. Después, la cubeta se sitúa en los dientes del usuario y permite conformar eficazmente la forma de los dientes del usuario. Un simple golpe o presión sobre las superficies internas y externas de la cubeta y particularmente las paredes interiores y exteriores, causará que la cubeta se conforme eficazmente a la forma de los dientes y arco del usuario.

10 Después de que la cubeta ha sido retirada de la boca del usuario, se calienta de nuevo, típicamente mediante los mismos medios, por ejemplo, introduciendo el mismo en un baño de agua caliente momentáneamente. La cubeta se deja luego enfriar. En esta configuración fría, la cubeta es eficazmente una imagen especular de los dientes y ambas superficies internas y externas. Así, la cubeta constituye un molde eficaz de los dientes del usuario. Generalmente, se usaría una cubeta para los dientes superiores y se usaría otra cubeta para la fila inferior de dientes.

15 Después de que la cubeta ha sido enfriada, se retira el inserto. Así, hay un espacio adicional entre la superficie frontal de los dientes y la superficie interior de la pared exterior y este espacio es eficazmente el reservorio. El inserto es una forma transversal relativamente delgada y típicamente es del orden de medio milímetro de espesor. Sin embargo, cualquier inserto de tamaño razonable puede usarse para este propósito. Además, el inserto se fabrica preferentemente del mismo material usado en la formación de la cubeta.

En otra realización, la cubeta se forma previamente con una forma adecuada para la aplicación de la composición blanqueadora a base de actinidina sobre los dientes del usuario.

20 La composición blanqueadora a base de actinidina puede usarse en la operación de blanqueamiento al aplicar la composición blanqueadora a base de actinidina en la cubeta y aplicar la cubeta sobre los dientes del usuario durante un periodo de tiempo y/o un número de aplicaciones necesarias para conseguir el resultado blanqueador deseado. La formulación a base de actinidina de la presente invención cuando se usa en una cubeta blanqueadora también puede incluir ingredientes adicionales listados anteriormente como "tirras blanqueadoras".

Dentífrico

30 La composición blanqueadora a base de actinidina de la presente invención puede usarse también cuando se formula con pastas de dientes y polvos dentales.

35 Las composiciones en forma de pastas de dientes, líquidos y pastas limpiadores de dentaduras, y similares, comprenderán generalmente un ligante o agente espesante. Los ligantes adecuados para uso en este texto incluyen polímeros de carboxivinilo, carragenano (preferido), hidroxietil-celulosa y sales solubles en agua o éteres de celulosa como carboximetil-celulosa de sodio y carboximetil-hidroxietil-celulosa de sodio. También pueden usarse las gomas naturales como goma karaya, goma xantano, goma arábica, y goma tragacanto. Se pueden usar silicato de aluminio y magnesio coloidal o sílice hidratado finamente dividido como parte del agente espesante para mejorar más la textura. Los ligantes/agentes espesantes pueden usarse en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5,0%, preferentemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% en peso de la composición total. Los activos son fluoruro y nitrato de potasio, sus niveles se describen en sus respectivos monográficos de la FDA para anti-cavidad y sensibilidad. Activo para gingivitis todavía están pendientes de la finalización del monográfico. Los abrasivos son carbonato de calcio, bicarbonato sódico o sílice hidratada.

40 Tales composiciones comprenderán típicamente uno o más edulcorantes y aromatizantes. Ejemplos de edulcorantes y aromatizantes adecuados para uso en dentífricos se discuten anteriormente, agentes reguladores de pH al igual que, tensioactivos, preservativos, estabilizantes, etc., se usan también a menudo en composiciones para dentífricos, ejemplos de los cuales también se proporcionan anteriormente.

45 También es deseable incluir algún material humectante en una pasta de dientes para preservar a la composición del endurecimiento hasta la exposición al aire. Un humectante preferido es carragenano. Ciertos humectantes pueden impartir también un dulzor deseable a las composiciones de pasta de dientes. Los dentífricos líquidos y los lavados bucales pueden contener también una cantidad de humectante. Los humectantes adecuados son bien conocidos en la técnica. Cuando están presentes, los humectantes representan generalmente aproximadamente el 10% a aproximadamente 70% en peso de las composiciones de la invención.

50 Los polvos dentales pueden hacer uso de muchos de los mismos ingredientes que las pastas de dientes excepto que deben mezclarse en un estado seco (es decir, molido en seco) o mezclados como composición líquida y luego secados vía, por ejemplo, varias técnicas de secado por pulverización. El secado por pulverización está descrito para cuando una forma líquida de una composición se pulveriza como un nebulizado en una cámara seca y caliente en la cual la porción acuosa del nebulizado se evapora por el calor seco de la cámara eliminándose solamente los

constituyentes secos de la composición en forma de polvo. La forma de polvo de la composición tiene un contenido de humedad de entre aproximadamente 0,1% a 5%. Los polvos dentales se rehidratan luego para uso bien por adición de agua (p.ej. con agua aplicada por el usuario) en el momento del uso o por la saliva del usuario.

5 Las composiciones limpiadoras dentales de la invención pueden incluir adicionalmente uno o más agentes de limpieza, precursores de peroxiácidos orgánicos, generadores de efervescencia, agentes quelantes, etc.

Lavado bucal y enjuague bucal

10 Típicamente, los lavados y enjuagues bucales de la presente invención comprenden la composición blanqueadora a base de actinidina de la presente invención en, por ejemplo, una solución de agua/glicerina y puede comprender adicionalmente uno o más aromas, humectante, edulcorante, agente espumante (p.ej. sulfato de laurilo de sodio) y colorantes tal como se han descrito anteriormente para las tiras blanqueadoras. Los lavados bucales pueden incluir glicerina en una cantidad de 0 a 60%, preferentemente de 0 a 30% en peso. El valor de pH de tales preparaciones para lavados bucales es generalmente de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 8,0 y preferentemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5. Un pH por debajo de 3,5 podría irritar la cavidad oral y disolver el esmalte dental. Un pH superior a 8,0 podría dar como resultado una sensación en la boca desagradable. Las preparaciones líquidas orales pueden contener también agentes activos superficiales, es decir, tensioactivos, en cantidades de hasta aproximadamente 5,0% y compuestos que proporcionan flúor en cantidades de hasta aproximadamente 2,0% en peso de la preparación.

Chicle

20 Las composiciones de chicles a base de actinidina de la presente invención pueden estar en forma de un chicle convencional. Las formas físicas adecuadas incluyen tiras, cuadrados y grageas (es decir, goma recubierta de azúcar; p.ej. Chiclets™). El chicle puede tener también un centro relleno de líquido en el cual el centro líquido contiene las composiciones blanqueadoras a base de actinidina (véase, p.ej. la patente de EE.UU. número 6 280 780). El chicle puede ser también una goma digestible o capaz de disolverse adecuada para chicle. Un chicle se retiene típicamente en una cavidad oral durante un tiempo suficiente para permitir a los ingredientes liberarse en contacto sustancialmente con todas las superficies dentales y/o tejidos orales con el propósito de actividad oral.

25 La expresión "materiales soporte" tal como se usan en este texto significa cualquier componente para chicle adicional seguro y eficaz usado en las composiciones para chicle de la presente invención. Tales materiales incluyen elastómeros, resinas, plastificantes, grasas, disolventes, ceras, emulsionantes, ablandadores, agentes aumentadores del volumen, edulcorantes, absorbentes, iones metálicos activos oralmente, material catiónico, fuentes de iones flúor, agentes anticáculos adicionales, agentes antimicrobianos, tampones, agentes blanqueadores, sales de bicarbonatos de metales alcalinos, materiales espesantes, humectantes, agua, tensioactivos, dióxido de titanio, agentes aromatizantes, xilitol, agentes colorantes y sus mezclas.

35 El chicle de la presente invención se fabrica por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la base de la goma se calienta a 45°C para ablandarla. El recipiente de mezclado se mantiene a 45°C durante todo el procedimiento de mezclado y los aditivos tal como se describe en este texto al igual que la composición blanqueadora a base de actinidina de la presente invención se adicionan y se mezclan hasta homogeneidad. Luego la mezcla de la goma se forma en tiras, cuadrados, etc., se envuelve y enfría. Si se desea, la goma se recubre con un recubrimiento de azúcar o glosina libre de azúcar.

EXPERIMENTAL

40 Ensayo de hidrólisis de caseína

El ensayo siguiente se usa para determinar la actividad de la actinidina cruda, actinidina purificada y las composiciones de actinidina de la presente invención.

Preparar los reactivos siguientes (se usa agua milli-Q o destilada para todas las diluciones).

45 El fosfato de hidrógeno de disodio 50mM se prepara fresco como sigue. Pesar 1,42 g de ortofosfato de hidrógeno de disodio anhidro en un vaso de precipitados de 250 ml (o equivalente). Añadir 160 ml de agua milli-Q. Disolver en un baño de agua caliente. Dejar enfriar, llevar hasta 200 ml en un matraz aforado usando agua milli-Q. Mezclar bien.

50 El sustrato se prepara fresco como sigue. Pesar 1,2 g de Hammarsten Casein (BDH, 440203H) en un vaso de precipitados de 250 ml (o equivalente). Añadir 160 ml de fosfato de hidrógeno de disodio. Calentar a 60-70°C durante 15 minutos. Dejar enfriar y ajustar el pH a 8,0 con NaOH 0,1M, usando un pH-metro. Llevar el volumen hasta 200 ml en un matraz aforado (o equivalente) usando agua milli-Q. Mezclar bien.

L-cisteína-EDTA se prepara como sigue. Pesar 8,78 g de L-cisteína HCl y 2,23 g de EDTA en un cilindro medidor de 1L. Añadir aproximadamente 800 ml de agua milli-Q. Ajustar el pH a 4,5 usando NaOH al 20% inicialmente luego NaOH 0,1 M hasta el final. Llevar hasta un volumen final de 1L usando milli-Q.

Ácido tricloroacético 0,11 M (TCA) se mezcló mediante protocolos estándares.

ES 2 395 314 T3

Determinar la dilución requerida tal como sigue. Pesar la cantidad requerida de la muestra (para actinidina cruda una masa típica es 1,5 g-1,6 g) en un matraz aforado de 100 ml y registrar el peso. Disolver y completar el volumen con L-cisteína/EDTA. Situar en un baño de hielo de ultrasonidos durante 10 minutos y luego en la nevera durante 50 minutos.

5 Preparar las siguientes diluciones:

Dilución	Enzima (ml)	L-cisteína/EDTA (ml)
1500	3	1,5
2000	2	2
2500	2	3
3000	1	2
4000	1	3
5000	1	4
6000	1	5
7000	1	6
8000	1	7
10000	1	9

Nota: mantener las disoluciones de las muestras en la nevera cuando no se estén usando

Preparar una muestra y un tubo de ensayo blanco (~20 ml) para cada disolución. (Véase, la Figura 3 para un mapa de dilución de ensayos). Dispensar 5 ml de sustrato en cada uno de los tubos de ensayo con muestra y 1 ml de solución de enzima en cada uno de los tubos de ensayo blanco. Situar el primer tubo de ensayo con muestra en el baño de agua a 37°C a 00.00 (minutos.segundos) minutos en el temporizador. Añadir un tubo de muestra cada minuto, a 01.00, 02.00 y así. A 10.00 minutos, añadir 1 ml de reactivo de enzima al primer tubo de ensayo con muestra, mezclar con un agitador tipo vortex durante quince segundos con pulsos cortos a 5 y 10 segundos. A 10 minutos, 30 segundos situar el primer tubo de ensayo blanco (que contiene solamente enzima) en el baño de agua a 37°C. Añadir 1 ml de enzima a la siguiente disolución de muestra a 11 minutos, agitar con vortex como antes. A 11 minutos, 30 segundos añadir el siguiente tubo blanco. Continuar este esquema con todos los tubos de ensayo de muestra y blancos. A 20 minutos dispensar 5 ml de disolución de TCA al y mezclar con un agitador tipo vortex durante quince segundos con pausas cortas a 5 y 10 segundos, luego situar en baño de agua. A 20 minutos, 30 segundos en el temporizador dispensar 5 ml de disolución de TCA en el primer tubo de ensayo blanco y agitar con vortex durante quince segundos tal como anteriormente, luego situar en el baño de agua. A 21 minutos dispensar 5 ml de TCA en el segundo tubo de ensayo de muestra, agitar con vortex durante quince segundos tal como anteriormente y luego situar en el baño de agua. Continuar este esquema con todos los tubos de ensayo de muestra y blancos. A 30 minutos, dispensar 5 ml de sustrato en el primer tubo de ensayo blanco y agitar con vortex durante quince segundos tal como anteriormente, luego situar en el baño de agua. Continuar este esquema con todos los tubos de ensayo de muestra y blancos restantes. Empezar a filtrar el primer tubo de muestra a 50 minutos, continuar filtrando los tubos de muestra uno cada minuto. Utilizar papeles de filtro Advantec #3, 110 mm, para filtración, plegar de manera que el lado liso del papel quede hacia fuera. A 60 minutos, 30 segundos filtrar la primera disolución blanco, a 61 minutos, 30 segundos filtrar la segunda disolución blanco y así. Mantener las disoluciones hasta que hayan alcanzado la temperatura ambiente (15-30 minutos). Agitar con vortex rápidamente. Inmediatamente leer la absorbancia a 275 nm; usar agua milli-Q como blanco. Determinar a partir de los resultados qué disolución tiene una diferencia de 0,10 ($\pm 0,01$), entre la absorbancia media de las muestras y la absorbancia media de los blancos. Tomar la disolución que muestre una diferencia de $0,10 \pm 0,01$ para llevar a cabo el ensayo final.

Ensayo final – usando la dilución determinada. Pesar la cantidad requerida de muestra en un matraz aforado de 100 ml y registrar el peso exacto. Pesar 65-70 mg de MAC (calibración de la medida basada en un lote de actinidina de actividad conocida) en un matraz aforado de 100 ml y registrar el peso exacto. Llevar cada uno hasta el volumen con L-cisteína/EDTA). Situar en un baño de hielo de ultrasonidos durante 10 minutos luego en la nevera durante 50 minutos. Diluir según lo apropiado para asegurar que la diferencia de absorbancia entre el blanco y las muestras sea $0,10 \pm 0,01$ unidades de absorbancia usando el ensayo de dilución como guía. Un máximo de dos muestras de producto terminado y una muestra MAC pueden ensayarse a la vez. Preparar tres tubos de ensayo de muestra y tres blancos de 20 ml por cada disolución. (Véase, la Figura 4 para el mapa de ensayos finales). Los resultados se aceptan solamente si la diferencia entre la absorbancia media de las muestras y los valores medios de los blancos es igual a $0,10 \pm 0,01$. Calcular la actividad como sigue:

$$\text{Unidades / mg} = \frac{(A_{10} - A_0)}{0,364} \times 50 \times 11 \times \frac{1}{10} \times DF$$

Unidad: la producción de un equivalente de aminoácido a 1 µg de tirosina por minuto. A10: densidad óptica de la mezcla de reacción. A0: densidad óptica de la mezcla blanco. 0,364: densidad óptica de tirosina (50 µg/ml). 50: tirosina (50 µg/ml). 11: calcular el Factor de Dilución (DF) como sigue:

$$DF = \frac{100 \text{ ml}}{\text{masa (mg)}} \times \frac{\text{volumen enzima (ml)} + \text{volumen diluyente (ml)}}{\text{volumen enzima (ml)}} \times 1000$$

5

100 ml = primer volumen de actinidina preparado. 1000: convertir de masa en mg a masa en g (según 1 g = 1 ml).

Preparación de muestras de ensayo

10 Con el fin de evaluar la bioactividad de la actinidina cruda, se midió una disolución preparada a partir de actinidina cruda con un ensayo blanqueador usando discos de hidroxiapatita cerámica densa manchados con una disolución de té y café. Se usó peróxido de hidrógeno como el control positivo y el disolvente, agua o glicerina acuosa como control negativo.

15 Los discos de hidroxiapatita cerámica densa (HAD) de 1,27 cm de diámetro x 0,10 – 0,13 cm de espesor (0,5" de diámetro x 0,04 -0,05" de espesor), (Clarkson Chromatography Products Inc., South Williamsport, PA) se enjuagaron con agua dos veces con el fin de limpiarlas. Los discos se mantuvieron en agua desmineralizada durante 1 hora. Durante este tiempo, las salivas clarificadas se prepararon con: parafilm masticable (ninguna comida o bebida 2 horas antes de muestrear) y recoger la saliva en un vial que luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Solamente se usó el sobrenadante. Los discos se retiraron del agua y se pusieron en 0,5 ml de saliva clarificada y se incubó durante toda la noche a 37°C sobre una plataforma agitadora a 90 rpm.

20 La siguiente mañana, se preparó una disolución fresca de té y café. Para el té, se sumergieron 50 ml de agua hirviendo en 2 bolsas de té de marca Lipton yellow en un vaso de precipitados de 100 ml, y se dejó durante 10 min. Para el café, se usaron 66 g de un café no descafeinado regular sin aroma en 1,6 L de agua mineral.

Se retiró la saliva de los discos y se añadieron 0,5 ml de café + 0,5 ml de té en el pocillo. La disolución y los discos se incubaron durante 3 horas sobre una plataforma agitadora a 90 rpm. La disolución de té + café se retiró y los discos se enjuagaron con agua dos veces y se secaron con un papel antes de tomar las medidas L, a, b.

25 Los discos se escanearon con un escáner Creoscitex Eversmart Jazz+ usando el programa informático Eversmart™ (Creo-Scitex, Billerica, MA). Se usó una resolución de aproximadamente 300 dpi para escanear y se redimensionó el objeto con una resolución de 15 dpi. Programa informático Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA). Se tomaron los valores L, a, b en el punto más oscuro.

Preparación de controles positivos

30 Se añadieron doscientos microlitros de una disolución de peróxido al 30% a 800 µl de agua desmineralizada (solución al 6%). Para la disolución al 3%, se usaron 100 µl de una disolución de peróxido en 900 µl de agua desmineralizada. La disolución se mezcló y se pusieron directamente 500 µl en 2 pocillos (controles positivos). Sobre dos pocillos solamente se añadió agua (control negativo).

Formulación de una Preparación que contiene actinidina para aplicación sobre los dientes

35 En viales de 3 mL, se pesaron 150 mg de actinidina cruda (para una disolución al 5%) y se añadieron 3 mL de agua desmineralizada a temperatura ambiente y se agitó durante 10 minutos a velocidad media usando una barra agitadora. Se ajustó el pH hasta aproximadamente 6,0 añadiendo algunas gotas de una disolución de NaOH 1 N. Se añadieron quinientos microlitros de la disolución de actinidina cruda sobre los discos en el pocillo. Cada ensayo se hizo por triplicado. El microplato se incubó a 37°C durante 60 minutos y se agitó a 90 rpm. Los discos se enjuagaron dos veces con agua. La superficie de los HAD se secó ligeramente con un papel absorbente y se midió el color (valor de L*, a* y b*).

40 El crudo de actinidina tiene un pH óptimo de entre aproximadamente 5,0-7,0 y es estable a un intervalo de pH de entre aproximadamente 4,0-8,0. También es estable por debajo de 50°C durante largos periodos de tiempo.

Valoración cuantitativa de color HAD

45 El color del HAD se midió antes y después del tratamiento usando el programa informático Adobe Photoshop. Después de escanear, se midieron el valor de los parámetros ópticos L*, a* y b* con Adobe. ΔL* representa la

diferencia de L antes y después del tratamiento que se refiere al cambio total de claridad y oscuridad. La diferencia de color total viene dada por ΔE^* calculado con una ecuación dada a continuación. Un valor alto de ΔL^* es indicativo de la claridad y un valor alto de ΔE es indicativo de un mayor cambio de color. Para ambos valores, cuanto mayor es el valor mejor es el tratamiento.

5
$$\Delta E = \text{sqrt}(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)$$

donde L*: 0= negro y 100= blanco

Almacenamiento de estándares

El control positivo (H₂O₂) y los ingredientes se almacenaron a 4°C.

RESULTADOS

10 Experimento de eficacia

La actinidina cruda del cinco por ciento fue capaz de retirar las manchas debido al café y té (véase, Tabla 1, Figura 1). Los resultados fueron mejores si la actinidina cruda se disolvía en una disolución de glicerina al 50% donde fueron comparables al tratamiento con una disolución de peróxido al 6%. La disolución de glicerina acuosa o de agua no tuvo efecto sobre el ΔL . Los resultados comparables se obtuvieron usando una disolución al 5% de actinidina purificada.

15

Tabla 1. Efecto de la actinidina cruda sobre el cambio de claridad y color (ΔL , ΔE), respectivamente, de discos de hidroxiapatita manchados con una mezcla de té y café comparado con peróxido.

Ingrediente	ΔL	Desviación estándar	ΔE	Desviación estándar
Actinidina cruda (5%)	10,33	2,08	15,9	1,55
Actidina cruda (5%) en glicerina al 50%	18,33	2,31	34,1	0,58
Peróxido (3%)	8,33	0,58	12,6	0,99
Peróxido (6%)	17,33	2,08	21,7	4,05
Glicerina al 50%	1,00	1,73	5,5	2,51
Agua	-1,00	4,36	6,3	2,35

Experimento de tiempo

20 Con el fin de determinar la duración necesaria para ver un afecto de actinidina cruda, se hizo un experimento de tiempo. Los discos se mantuvieron en una disolución de actinidina cruda al 5% (glicerina acuosa al 50%) durante 5, 10, 15, 30, 45 y 60 min. El pH se ajustó a 5,75 con NaOH. El peróxido de hidrógeno al 3% y 6% se usó como controles positivos y se usó una disolución de glicerina al 50% como control negativo. Los resultados (véanse, Tabla 2, Figura 2) muestran que la disolución de actinidina cruda dio resultados positivos en la banda después de 5 minutos, después de 30 minutos el tratamiento es comparable con una disolución de peróxido al 3%. Después de un

25 tratamiento de 60 minutos, los resultados fueron superiores a una disolución de peróxido al 6%. La disolución de glicerina acuosa no tuvo efecto sobre la coloración de los discos.

Tabla 2. Efecto del tiempo sobre la eficacia del crudo de una disolución de actinidina cruda al 5% (CA) sobre el cambio de claridad y color (ΔL , ΔE), respectivamente, de discos de hidroxiapatita manchados con una mezcla de té y café comparado con peróxido.

Ingrediente	Tiempo (min.)	ΔL	Desviación estándar	ΔE	Desviación estándar
CA (5%) en glicerina al 50%	5	2,67	2,08	6,17	2,74
CA (5%) en glicerina al 50%	10	2,00	1,73	5,15	2,17
CA (5%) en glicerina al 50%	15	3,67	1,53	7,81	2,12
CA (5%) en glicerina al 50%	30	7,00	3,00	11,47	4,93

ES 2 395 314 T3

Ingrediente	Tiempo (min.)	ΔL	Desviación estándar	ΔE	Desviación estándar
CA (5%) en glicerina al 50%	45	8,67	3,51	15,99	5,40
CA (5%) en glicerina al 50%	60	12,00	3,46	21,07	6,20
Peróxido (3%)	60	7,50	0,71	11,38	0,28
Peróxido (6%)	60	10,00	1,40	13,76	1,85
glicerina al 50%	60	-1,50	0,70	3,45	2,87

REIVINDICACIONES

1. Un método libre de peróxido para el blanqueamiento de dientes naturales o fabricados, comprendiendo el método:
- a) proporcionar una preparación que contiene actinidina;
- 5 b) formular la preparación que contiene actinidina de la etapa a) para aplicación a dientes naturales o fabricados; y
- c) poner en contacto la formulación de la etapa b) con dientes naturales o fabricados en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para efectuar el blanqueamiento de dientes naturales o fabricados;
- 10 en el que la preparación que contiene actinidina se formula en: una tira blanqueadora, un dentífrico; un enjuague bucal, un lavado bucal; chicle; una preparación para sumergir dientes fabricados; o una cubeta blanqueadora.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la preparación que contiene actinidina tiene una actividad mínima de actinidina de 50 U/g.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la preparación que contiene actinidina tiene una concentración mínima final en la preparación de actinidina cruda de al menos 1,0% en peso.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que la preparación que contiene actinidina se formula en una tira blanqueadora, y la preparación también comprende glicerina en una concentración de 5 a 30% en peso.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la preparación que contiene actinidina es un extracto de kiwi.
6. Un producto libre de peróxido para uso en un método para blanquear dientes naturales o fabricados, comprendiendo el producto:
- 20 a) una tira polimérica para contacto con, para blanqueamiento de, dientes naturales o fabricados, estando recubierta la tira polimérica con una preparación que contiene actinidina libre de peróxido; o
- b) un dentífrico que comprende una preparación que contiene actinidina libre de peróxido; o
 - c) estando recubierto una cubeta blanqueadora con una preparación que contiene actinidina libre de peróxido.
- 25 7. El producto de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la preparación que contiene actinidina es un extracto de kiwi.

FIGURA 1

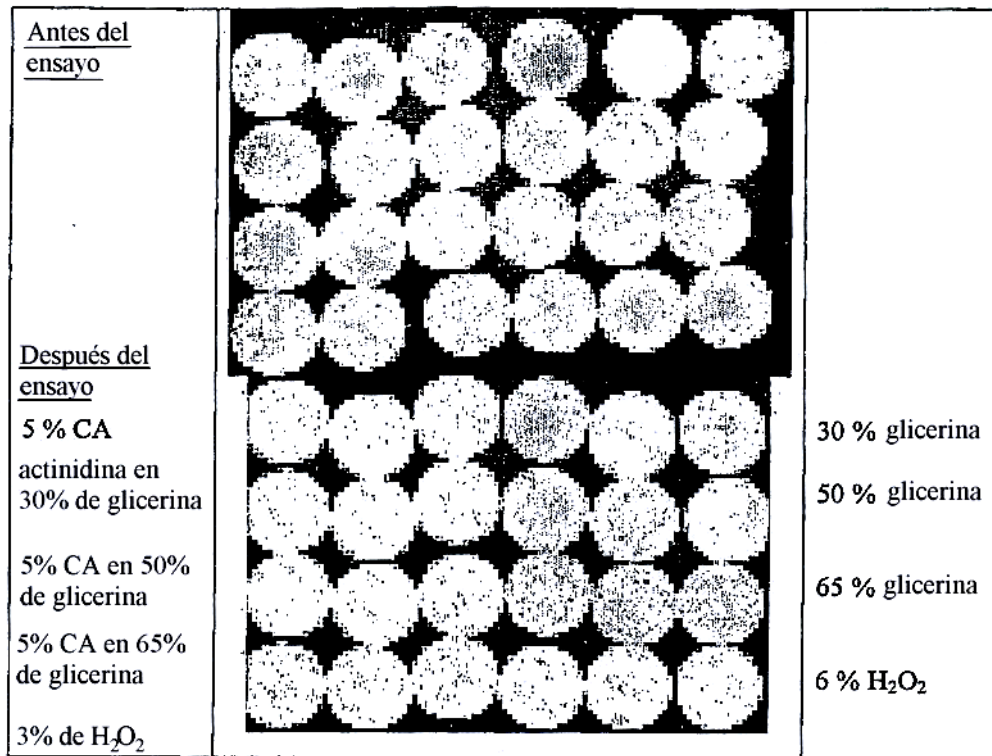


FIGURA 2

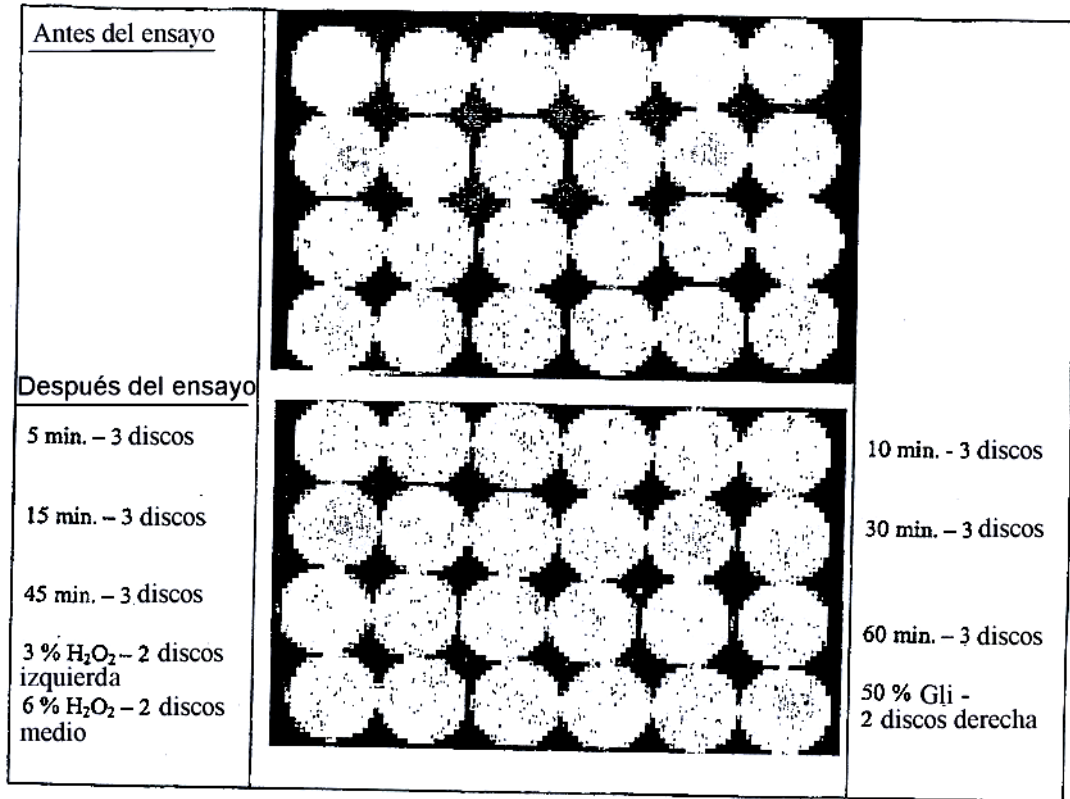


FIGURA 3

Mapa de Dilución

Añadir el primer tubo de muestra al baño de agua a 00.00 luego cada minuto tal como se describe a continuación.

0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub
	0.00		1.00		2.00		3.00		4.00		5.00		6.00		7.00		8.00		9.00
Muestras																			
0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
Blancos																			

Añadir enz a cada disolución de muestra cada minuto tal como se muestra a continuación

Añadir el tubo de l blanco cada minuto tal como se muestra a continuación

0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz
	10.00		11.00		12.00		13.00		14.00		15.00		16.00		17.00		18.00		19.00
Muestras																			
0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz	0	enz
	10.30		11.30		12.30		13.30		14.30		15.30		16.30		17.30		18.30		19.30
Blancos																			

Añadir TCA a la 1ª muestra a 20.00, y el 1º blanco a 20.30, continuar tal como se muestra a continuación

0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA
	20.00		21.00		22.00		23.00		24.00		25.00		26.00		27.00		28.00		29.00
Muestras																			
0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA	0	TCA
	20.30		21.30		22.30		23.30		24.30		25.30		26.30		27.30		28.30		29.30
Blancos																			

Añadir substrato a la 1ª disolución a 20.30, continuar tal como se describe a continuación

0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
Muestras																			
0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub	0	Sub
	30.30		31.30		32.30		33.30		34.30		35.30		36.30		37.30		38.30		39.30
Blancos																			

Filtrar la 1ª disolución de muestra a 50.00, continuar tal se ha descrito.

Filtrar la 1ª disolución de blanco a 60.30, continuar tal como se ha descrito

0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar
	50.00		51.00		52.00		53.00		54.00		55.00		56.00		57.00		58.00		59.00
Muestras																			
0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar	0	Filtrar
	60.30		61.30		62.30		63.30		64.30		65.30		66.30		67.30		68.30		69.30
Blancos																			

FIGURA 4

Mapa de Ensayo Final

Añadir sustrato para la primera muestra en el baño de agua a 00.00 y continuar tal como se ha descrito

Muestra. A		Muestra. B		Muestra. C	
0 Sub	0	0 Sub	0	0 Sub	0
0.00		3.00		6.00	
0 Sub	0	0 Sub	0	0 Sub	0
1.00		4.00		7.00	
0 Sub	0	0 Sub	0	0 Sub	0
2.00		5.00		8.00	
Muestras	Blancos	Muestras	Blancos	Muestras	Blancos

Añadir enzima a la 1ª muestra a 20.00, y añadir el primer blanco a 20.30
Continuar tal como se muestra a continuación

Muestra. A		Muestra. B		Muestra. C	
0 enz	0 enz	0 enz	0 enz	0 enz	0 enz
10.00	10.30	13.00	13.30	16.00	16.30
0 enz	0 enz	0 enz	0 enz	0 enz	0 enz
11.00	11.30	14.00	14.30	17.00	17.30
0 enz	0 enz	0 enz	0 enz	0 enz	0 enz
12.00	12.30	15.00	15.30	18.00	18.30
Muestras	Blancos	Muestras	Blancos	Muestras	Blancos

Añadir TCA a la 1ª muestra a 20.00, y el primer blanco a 20.30
continuar tal como se muestra a continuación

Muestra. A		Muestra. B		Muestra. C	
0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA
20.00	20.30	23.00	23.30	26.00	26.30
0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA
21.00	21.30	24.00	24.30	27.00	27.30
0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA	0 TCA
22.00	22.30	25.00	25.30	28.00	28.30
Muestras	Blancos	Muestras	Blancos	Muestras	Blancos

Añadir Sustrato a la 1ª disolución de blanco a 30.30, continuar tal como se ha descrito

Muestra. A		Muestra. B		Muestra. C	
0	0 Sub	0	0 Sub	0	0 Sub
	30.30		33.30		36.30
0	0 Sub	0	0 Sub	0	0 Sub
	31.30		34.30		37.30
0	0 Sub	0	0 Sub	0	0 Sub
	32.30		35.30		38.30
Muestras	Blancos	Muestras	Blancos	Muestras	Blancos

Filtrar las disoluciones tal como se muestra a continuación

Muestra. A		Muestra. B		Muestra. C	
0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar
50.00	60.30	53.00	63.30	56.00	66.30
0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar
51.00	61.30	54.00	64.30	57.00	67.30
0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar	0 Filtrar
52.00	62.30	55.00	65.30	58.00	68.30
Muestras	Blancos	Muestras	Blancos	Muestras	Blancos