

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 159**

51 Int. Cl.:

A61K 8/21 (2006.01)

A61K 8/69 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2008 E 08736559 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2146683**

54 Título: **Utilización de un extracto acuoso de pepitas de uva en asociación con por lo menos una sal de flúor contra la formación o la acumulación de la biopelícula dental y las composiciones que comprenden esta asociación**

30 Prioridad:

24.04.2007 FR 0754670

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

04.12.2015

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

VEZIN, JEAN-CLAUDE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 553 159 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

Utilización de un extracto acuoso de pepitas de uva en asociación con por lo menos una sal de flúor contra la formación o la acumulación de la biopelícula dental y las composiciones que comprenden esta asociación.

La presente invención se refiere a la asociación de un extracto acuoso de pepitas de uva en asociación con una sal de flúor para su utilización como composición anti-adhesión de higiene bucal destinada a prevenir y/o disminuir la formación y la acumulación de la biopelícula dental sobre las superficies dentales o el tejido epitelial gingival, así como las enfermedades buco-dentales asociadas, preservando al mismo tiempo el equilibrio del ecosistema bucal.

La cavidad bucal constituye un verdadero nicho ecológico por el que transitan y residen la saliva, los alimentos, el aire y los productos bacterianos.

En la cavidad bucal, las bacterias puede adoptar dos modos de vida radicalmente diferentes: o bien en estado planctónico, en el que los organismos aislados flotan en el medio bucal, o bien aquél en el que en una biopelícula, las bacterias unidas a una superficie dental viven en comunidad.

La salud dental y periodontal puede ser considerada como un estado de equilibrio en el que la población bacteriana coexiste con el hospedante y en el que no aparece ningún daño irreparable en los tejidos de este último. Sin embargo, la enfermedad puede aparecer cuando la composición y las actividades metabólicas de las comunidades de la biopelícula dental son perturbadas.

Las lesiones periodontales aparecen en primer lugar a nivel de la encía, provocando unas gingivitis, inflamaciones de la encía marginal. Después, pueden evolucionar en periodontitis, que afecta al conjunto del periodontal y se vuelven irreversibles en ausencia de tratamiento.

Existen diferentes formas de gingivitis:

- gingivitis asociada a la presencia de placa, denominada negligencia común,
- gingivitis aguda ulcero-necrótica,
- gingivitis cuyo origen no está relacionado con la placa:
 - o asociada a enfermedades cutáneas;
 - o limitada a la encía o que afecta al conjunto de la mucosa bucal;
 - o alérgica;
 - o infecciosa.

La biopelícula dental (o placa dental) es una acumulación heterogénea, que se adhiere a la superficie de los dientes o situada en el espacio gingivo-dental, compuesta por una comunidad microbiana rica en bacterias aerobias o anaerobias, revestida de una matriz intercelular de polímeros de origen microbiano y salivar. Se trata de una organización bacteriana compleja, cuyas primeras fases de formación corresponden a un depósito de glicoproteínas sobre las superficies de los tejidos duros o de los tejidos blandos bañados en la saliva. Esta primera capa lleva el nombre de película exógena adquirida (PEA) o también "biopelícula salivar". Está secundariamente colonizada por unos microorganismos que se organizarán en función de criterios fisicoquímicos, nutricionales o relacionales y constituirán así un depósito blando, adherente, persistente, y de color blanco amarillento, en la superficie de los dientes y de los materiales dentales utilizados habitualmente.

Se distinguen dos tipos de placas definidos en función de su localización anatómica con respecto a la encía: la placa supragingival y la placa subgingival. Estos dos tipos de placas constituyen dos microentornos diferentes. El entorno supragingival está bañado por la saliva, mientras que el entorno sub-gingival está bañado por el fluido del surco gingival. El entorno supragingival es sobre todo aeróbico, mientras que el entorno sub-gingival es casi exclusivamente anaeróbico. El espacio sub-gingival tiene la forma de un fondo de saco, sin desvío de fluidos, y las fuerzas mecánicas susceptibles de disgregar las poblaciones bacterianas establecidas se encuentran raramente. Por el contrario, las zonas supragingivales están barridas continuamente por la saliva, expuestas a todos los mecanismos de atrición propios de la cavidad bucal (masticación, deglución, fonación) y directamente accesibles a las medidas de higiene.

La placa supragingival y la placa sub-gingival se distinguen también por su potencial patogénico: la placa supragingival está específicamente implicada en la patología de formación de caries, mientras que la placa sub-gingival está asociada a las patologías gingivales y periodontales. Las principales bacterias encontradas en la placa supragingival son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus sp.*, y *Actinomyces sp.* (*A. viscosus*). En función de su situación en el lado de los dientes o en el lado del epitelio, la composición de la flora subgingival varía de manera importante. Se señala la presencia de *Porphyromonas gingivalis* y de *Fusobacterium nucleatum*, que están así muy implicadas en las patologías periodontales.

Los agentes antisépticos bactericidas se utilizan frecuentemente en las composiciones para reducir la placa dental. Sin embargo, los agentes bactericidas no son completamente satisfactorios, ya que su fuerte acción antiséptica puede inducir un desequilibrio dentro de la población bacteriana natural de la cavidad bucal. En efecto, los productos antisépticos actúan sobre los microorganismos:

- de manera drástica: estando la evaluación de la actividad basada en una noción de reducción logarítmica, es decir una destrucción o una inactivación de un número elevado de microorganismos,
- rápidamente: considerando un tiempo de contacto corto y una inactivación de la mayoría de las moléculas en contacto, en particular, con las materias orgánicas.

Además, su utilización en el tiempo debe ser limitada ya que pueden favorecer la selección de cepas resistentes.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar unos agentes capaces de limitar o suprimir el depósito de la biopelícula por una acción anti-adhesión, y que permita así conservar una buena salud bucodental sin efectos secundarios y sin perturbar el equilibrio del ecosistema bucal. Este concepto se basa en una acción no a nivel del crecimiento o de la viabilidad celular, sino a nivel de las interacciones de la célula bacteriana con el conjunto de las superficies bucales: superficies duras (por ejemplo esmalte dental), mucosas, así como entre células bacterianas.

Se ha descubierto de manera sorprendente que dichos agentes anti-biopelícula respetuosos con el equilibrio de la flora bacteriana bucal pueden ser extraídos de las pepitas de uva.

La uva contiene numerosos principios activos, entre ellos los polifenoles. Las pepitas de uva contienen sobre todo unos polifenoles de tipo oligo-proantocianidinas (OPC) que son conocidos por su fuerte poder antioxidante.

Los extractos de pepitas de uva están indicados en el tratamiento de la insuficiencia venosa y de las varices, para atenuar el estrés ocular causado por el deslumbramiento, o para acelerar la curación de las tumefacciones consecutivas a una herida o a una cirugía.

Los OPC de pepitas de uva se utilizan también en el campo de la cosmetología como agente anti-radicalario para luchar contra el envejecimiento de la piel.

La utilización de extractos de plantas ricas en polifenoles por su acción antibacteriana, en particular para la higiene bucal, por ejemplo para la prevención de la periodontitis, se describe en el documento EP 1 072 254. Sin embargo, este documento no describe el problema técnico de la presente invención, ni incluso la utilización de extractos de pepitas de uva.

Además, el documento US nº 5.470.565 divulga la utilización de una asociación de polifenoles de té con una sal de flúor para reforzar la resistencia ácida de los dientes.

Por otro lado, el documento FR 2 318 632 describe la utilización de sales de flúor solas para la prevención y el tratamiento de las periodontopatías.

El documento DE 199 49 575 describe una combinación de flavonoides con unos fluoruros de amonio para luchar contra las bacterias, problema técnico diferente del de la presente invención, que consiste en proporcionar una composición destinada a la higiene bucal que permite luchar contra la biopelícula dental aportando una acción anti-adhesión y no por una acción clásica antiséptica fuerte. Así, no se menciona ni se evalúa la actividad anti-adhesión de las composiciones descritas en el documento DE 199 49 575. Además, los flavonoides utilizados en este documento son unos flavonoides de síntesis puros, y nada sugiere que un extracto de pepitas de uva sea tan eficaz.

El documento US 2003/0103914 describe unas composiciones de cuidado bucal estables que tienen como objetivo combatir la halitosis que comprende:

- un extracto de pepitas o de pulpa de la familia de los *Citrus* (cítricos) o *Vitis* (uvas) y sus mezclas,
- un agente activo de cuidado bucal seleccionado de entre los agentes anti-sarro, anti-placa, los iones fluoruros, los agentes de desensibilización, los agentes contra el mal aliento, los antagonistas H2, y sus mezclas.
- un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Sin embargo, solo se describen en este documento los efectos antibacterianos de los extractos de plantas de la familia *Citrus* y *Vitis* (véase [0011] a [0013]). Así, este documento no menciona el problema técnico de la presente invención.

El documento US 2003/0103914 propone una elección muy amplia (varias decenas) de agentes a combinar con los

extractos de plantas mencionados anteriormente, y orienta al experto en la materia hacia los polifosfatos ([0053], [0056] y reivindicación 12), las sales metálicas (reivindicaciones 13 a 16, [0005], [0063] a [0065], y no hacía las sales de flúor.

5 Se ha descubierto de manera sorprendente que los extractos de pepitas de uva pueden ser utilizados en el campo de la higiene buco dental como agentes anti-biopelícula.

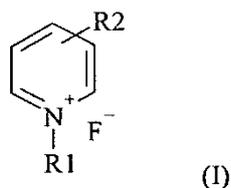
10 Los inventores han descubierto por otro lado de manera sorprendente que la acción anti-biopelícula del extracto de pepitas de uva está potenciada por las sales de flúor, tales como el fluoruro de sodio o el fluorinol (fluorhidrato de 3-piridilmetanol).

15 La presente invención tiene por objeto la asociación de un extracto acuoso de pepitas de uva en asociación con por lo menos una sal de flúor para su utilización como composición de higiene bucal destinada a prevenir y/o disminuir la formación o la acumulación de la biopelícula dental sobre las superficies dentales o el tejido epitelial gingival, preservando al mismo tiempo el equilibrio de la flora bacteriana.

Las sales de flúor según la presente invención son preferentemente unos fluoruros inorgánicos, unos fluoruros de aminas o unos fluoruros de amonio cuaternario.

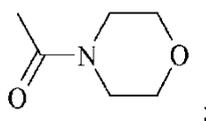
20 Los fluoruros inorgánicos se pueden seleccionar en particular de entre los fluoruros de potasio, de sodio y de estaño, así como sus mezclas.

Los fluoruros de amina se seleccionan preferentemente de entre las sales que responden a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

- 30
- * R1 = H, alcoilo;
 - * R2 = -CH₂-OH, carboxilato de alcoilo, -CO-NH-CH₂-CH₂-OH,



35 y R2 se encuentra en posición 2 o 3.

El extracto acuoso de pepitas de uva según la presente invención presenta la característica de ser rico en polifenoles, en particular en proantocianidinas (OPC).

40 La fracción másica de polifenoles en dicho extracto es preferentemente superior al 50%, preferentemente superior al 90%.

La fracción másica de proantocianidinas en dicho extracto está preferentemente comprendida entre el 20 y el 50%.

La composición másica en OPC del extracto es preferentemente la siguiente:

- 45
- Oligómeros:
 - o B1: entre el 1 y el 4%, preferentemente aproximadamente 2,5%
 - o B2: entre el 5 y el 9%, preferentemente alrededor del 7,5%
 - o B3: hasta el 3%, preferentemente aproximadamente 1,7%
 - o B4: entre el 1 y el 4%, preferentemente aproximadamente 2,6%
 - Monómeros:
 - o Catequina: entre el 3 y el 6%, preferentemente aproximadamente 4,7%
 - o Epicatequina: entre el 12 y el 15%, preferentemente aproximadamente 13,3%
 - o Epicatequina 30 galato: hasta el 2%, preferentemente aproximadamente 0,7%.
- 55

El extracto acuoso de pepitas de uva según la presente invención se puede obtener por extracción acuosa con agua azufrada de orujo de uva blanca o roja, preferentemente blanca. Durante esta extracción, se puede utilizar como disolvente una solución acuosa de anhídrido sulfuroso preparada disolviendo metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) en agua y ajustando el pH a 3,8 con ácido acético. Después, se pueden efectuar las etapas siguientes:

- centrifugación para eliminar las materias en suspensión insolubles;
- filtración para eliminar en particular el ácido tártrico, los azúcares, los polisacáridos y los minerales;
- evaporación;
- y después, eventualmente una nueva extracción con agua sulfurada, seguida de una centrifugación, filtración, evaporación, hasta recuperar un concentrado en forma líquida;
- pasteurización ultrarrápida;
- atomización, si se desea que el extracto se presente en forma de polvo.

Según la presente invención, el extracto acuoso de pepitas de uva está preferentemente asociado al fluoruro de sodio o al fluorinol ($\text{R}_1 = \text{H}$ y $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{OH}$ en posición 3 con respecto al nitrógeno). El extracto acuoso de pepitas de uva está más preferentemente asociado al fluorinol.

La presente invención tiene también por objeto la utilización de un extracto acuoso de pepitas de uva en asociación con por lo menos una sal de flúor, en particular las descritas anteriormente, para la preparación de una composición para la higiene bucal destinada a:

- prevenir la formación del sarro o la aparición de enfermedades buco dentales relacionadas con la acumulación de la biopelícula.

En efecto, la composición según la presente invención, además de su efecto preventivo, puede disminuir también el índice de placa en personas que presentan ya una biopelícula bucal.

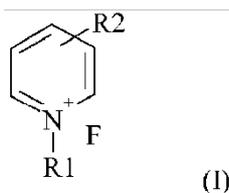
En particular, la asociación según la presente invención permite prevenir unas enfermedades buco-dentales tales como las caries, las gingivitis o las periodontitis, cuyo origen está relacionado con la acumulación de biopelícula.

La acción anti-adhesión de la composición se pone en evidencia por la solicitante:

- por un lado sobre un modelo experimental de la biopelícula bucal desarrollado a partir de una suspensión que contiene diferentes bacterias bucales, sobre unos discos de hidroxapatita;
- y mostrando, por otro lado, la actividad inhibidora de dicha composición sobre la reacción enzimática de las glucosiltransferasas.

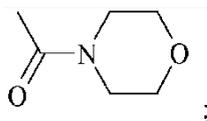
La presente invención tiene también por objeto una composición para la higiene bucal que comprende una asociación de un extracto acuoso de pepitas de uva y de por lo menos una sal de flúor, tales como se han descrito anteriormente.

Así, las sales de flúor se pueden seleccionar de entre unos fluoruros inorgánicos tales como los fluoruros de potasio, de sodio y de estaño, así como sus mezclas, o de entre los fluoruros de amina, tales como los que responden a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

- * $\text{R}_1 = \text{H}$, alcoilo;
- * $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{OH}$, carboxilato de alcoilo, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$,



y R2 se encuentra en posición 2 o 3.

- 5 La composición según la presente invención contiene preferentemente un extracto acuoso de pepitas de uva en asociación con fluoruro de sodio o fluorinol. (R1 = H y R2 = -CH₂OH en la posición 3 con respecto al nitrógeno). El extracto acuoso de pepitas de uva está más preferentemente asociado al fluorinol.

10 La composición según la presente invención puede presentarse en forma de un enjuague bucal, de un gel o de una pasta de dientes, de un gel gingival, de una goma de mascar, de una pastilla para chupar, de un hilo dental, de una cápsula extruida, de hebras para cepillo de dientes, de un apósito adhesivo, de una toallita empapada, de una pasta adhesiva para dentaduras postizas y prótesis o de una pasta profiláctica de pulido.

15 Se puede considerar también asociar a la composición según la presente invención, por lo menos otro principio activo antibiopelícula, tal como un extracto de arándano rojo (o *Vaccinium niacrocarpum*).

Dicha composición puede contener además siliglicol y/o vitamina E y/o vitamina C.

20 Dicha composición contiene preferentemente entre 50 µg/ml y 10000 µg/ml, ventajosamente entre 200 µg/ml y 5000 µg/ml y de manera más ventajosa entre 1000 µg/ml y 3000 µg/ml y de manera aún más ventajosa aproximadamente 2000 µg/ml de dicho extracto de pepitas de uva.

25 Dicha composición contiene preferentemente entre 50 ppm y 10000 ppm, más preferentemente entre 500 ppm y 2000 ppm; y aún más preferentemente entre 1000 ppm y 1500 ppm de flúor. De manera ventajosa, la composición comprende aproximadamente 1500 ppm de flúor.

30 Preferentemente, la composición según la presente invención contiene entre 1000 µg/ml y 3000 µg/ml del extracto acuoso de pepitas de uva y entre 500 ppm y 2000 ppm de flúor, y de manera aún más preferida aproximadamente 2000 µg/ml del extracto de pepitas de uva y entre 1000 ppm y 1500 ppm de flúor.

La figura 1 representa el efecto del extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 en asociación con el fluorinol sobre el crecimiento de estreptococos y *Porphyromonas gingivalis* sobre un modelo experimental de biopelícula bucal en acción preventiva.

35 La figura 2 presenta el efecto del extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 en asociación con NaF sobre el crecimiento de estreptococos y *Porphyromonas gingivalis* sobre un modelo experimental de biopelícula bucal en acción preventiva.

40 La presente invención se ilustra por los ejemplos siguientes.

Ejemplos

1) Preparación de un extracto acuoso de pepitas de uvas

45 El extracto acuoso de pepitas de uva está proporcionado por la "Société Française de Distilleries". Se obtiene por extracción con agua sulfurada de orujo de uva blanca según las técnicas convencionales de extracción, bien conocidas por el experto en la materia.

Las características del extracto son las siguientes:

- 50
- Apariencia: polvo fino
 - Color: ocre
 - Sabor: astringente
 - Densidad: 0,35 a 0,55 g/ml
 - 55 • Humedad: < 8%

El análisis por HPLC del extracto da la composición siguiente:

❖ Oligómeros:

- 60
- B1: 2,56%
 - B2: 7,51%

- B3: 1,72%
- B4: 2,61%

❖ Monómeros:

- Catequina: 4,69%
- Epicatequina: 13,32%
- Epicatequina 30 Galato: 0,66%

❖ Total OPC identificadas: 33,00%

2) Acción preventiva sobre un modelo experimental de biopelícula bucal

2.1) Protocolo

a) Cepas bacterianas y preparación del inóculo

Las cepas bacterianas utilizadas son:

- *Streptococcus mutants* ATCC 25175
- *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478
- *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Estas diferentes bacterias, en cultivo en su medio específico, son inoculadas en 10 ml de medio de cultivo universal FUM ("Fluid Universal Medium", composición del medio en anexo 1), y después puestas en incubación en anaerobiosis a 37°C durante 24 horas.

Después de la verificación microscópica de la pureza, las series de cultivos son ajustadas de manera independiente a DO₅₅₀ 1,0 +/- 0,05 (es decir aproximadamente 10⁷ células por mililitro) por unas diluciones con FUM. Se reúnen unas alícuotas (1 ml) de cada cultivo ajustado a la correcta DO, constituyendo así la suspensión bacteriana que sirve para inocular el medio a partir del cual se desarrollará la biopelícula.

b) Preparación de la saliva

Se recoge saliva sin estimulación, en voluntarios sanos (después de la obtención de su claro consentimiento), por lo menos una hora y treinta minutos después de haber comido, bebido o haberse lavado los dientes.

Las diferentes muestras de saliva recogidas son mezcladas, centrifugadas (30 minutos, 4°C, 15000 rpm) y se pasteuriza el sobrenadante (30 minutos, 65°C), y se centrifuga de nuevo en tubos estériles. Este sobrenadante así obtenido se reparte en tubos de 50 ml y se almacena a -20°C. La eficacia de la pasteurización se verifica por esparcimiento de muestras de saliva sobre agar con sangre. Después de 72 horas de cultivo a 37°C, no se observa ningún CFU.

c) Tratamiento preventivo de las biopelículas

La biopelícula se desarrolla en unos discos de hidroxiapatita esterilizados en autoclave a 125°C durante 20 minutos.

- A. La primera etapa es la formación de la película adquirida en la superficie de los discos. Cada disco se coloca en uno de los pocillos de una caja de cultivo estéril de 24 pocillos de poliestireno y se pone en incubación con 800 µl de saliva durante 4 horas, a temperatura ambiente con una agitación suave.
- B. La saliva se aspira después de cada pocillo y se sustituye por una mezcla que contiene: 800 µl de saliva + 1000 µl de FUM que contiene un 0,15% de glucosa y un 0,15% de sacarosa + 200 µl de la suspensión que contiene las diferentes bacterias bucales (igual cantidad de cada una).
- C. Después, las diferentes cantidades de las asociaciones a ensayar se añaden en los pocillos con el fin de obtener las concentraciones deseadas (cada concentración se ensaya por triplicado). Véanse las tablas 1 y 2.

Tabla 1

Experimento nº1		
Productos	Cantidades añadidas	Concentración final ensayada
Control	153 µl de suero fisiológico (SP)	
Extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 (solución a 100 mg/ml)	43 µl de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 110 µl SP	2000 µg/ml

Experimento n°1		
Productos	Cantidades añadidas	Concentración final ensayada
Fluorinol (solución al 20%)	73 µl Fluorinol + 80 µl SP	0,68% Fluorinol (= 0.1% Flúor)
Fluorinol (solución al 20%)	110 µl Fluorinol + 43 µl SP	1,02% Fluorinol (= 0.15% Flúor)
Extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 (100 mg/ml) + Fluorinol (20%)	43 µl de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 73 µl de Fluorinol + 37 µl SP	2000 µg/ml de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 0,68% Fluorinol (1000 ppm Flúor)
Extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 (100 mg/ml) + Fluorinol (20%)	43 µl de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 110 µl de Fluorinol	2000 µg/ml de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 1,02% Fluorinol (1500 ppm Flúor)

Tabla 2

Experimento n°2		
Productos	Cantidades añadidas	Concentración final ensayada
Control	229 µl de suero fisiológico (SP)	
Fluorinol (solución al 20%)	114 µl Fluorinol + 115 µl SP	1,02% Fluorinol (= 0.15% Flúor)
Extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 (100 mg/ml) + Fluorinol (20%)	45 µl de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 114 µl de Fluorinol + 45 µl SP	2000 µg/ml de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 1,02% Fluorinol (1500 ppm Flúor)
NaF (solución a 4%)	184 µl NaF + 45 µl SP	0,33% NaF (1500 ppm Flúor)
Extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 (100 mg/ml) + NaF	45 µl de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 184 µl NaF	2000 µg/ml de extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 + 0,33% NaF (1500 ppm Flúor)

5 La caja de 24 pocillos se incuba después en anaerobiosis a 37°C durante 64 h.

10 D. Análisis de las biopelículas después de 64 h de incubación. Los discos se lavan con una solución de suero fisiológico para eliminar las bacterias no adherentes. Cada disco se coloca después en una caja de Petri estéril, y la superficie del disco se rasca con una legra estéril (instrumento de periodontología). La superficie del disco raspado así como la caja de Petri son aclarados con suero fisiológico. El volumen recuperado de lavado es completado con el fin de obtener un volumen final de 1 ml y la suspensión celular se agita vorticialmente.

15 Se realizan unas diluciones seriales a 1:10 de esta suspensión celular hasta alcanzar unas concentraciones de 10^{-2} y 10^{-4} , y después se esparcen 50 µl de estas diluciones sobre los 4 agares específicos utilizados: mitis salivarius, MRS, wilkin chalgren, (WCA) y agar con sangre. Los agares se colocan después en anaerobiosis a 37°C durante 48-72 h y después se recuenta el número de colonias formadas para cada especie.

20 La diferenciación de las dos especies bacterianas se efectúa por observación de la morfología de las colonias sobre agar en paralelo con una observación al microscopio. Los agares mitis salivarius permiten obtener el número de estreptococos y los agares WCA el número de *Porphyromonas*.

25 El número de colonias formadas después de 48-72 h de incubación de las moléculas con las biopelículas bacterianas se expresa, después del recuento, en Unidades que Forman Colonias por biopelícula analizada (o UFC/Biopelícula) mediante la fórmula:

$$[\text{Número de colonias contadas} \times \text{factor de dilución} (10^2 \text{ a } 10^4)] / \text{Volumen de inóculo} (0,05 \text{ ml})$$

30 Después, se realiza la media así como la desviación estándar de los tres resultados de UFC/Biopelícula obtenidos para cada concentración de molécula ensayada y para cada grupo de bacteria analizada. El gráfico (eje de las ordenadas logarítmica) se realiza en Excel tomando la media de las 2UFC/Biopelícula en función de la bacteria contada.

35 2.2) Resultados/Conclusiones

Se observa que el extracto de pepitas de uvas según el ejemplo 1 solo conlleva una disminución significativa superior a 1 \log_{10} del número total de bacterias en la biopelícula desarrollada en los discos de hidroxiapatita. Véase la figura 1.

40 El extracto de pepitas de uva según el ejemplo 1 permite por lo tanto limitar el desarrollo de la biopelícula.

Por otro lado, se observa que el efecto de la asociación extracto de pepita de uva/fluorinol posee una actividad superior a 3 \log_{10} sobre *Streptococcus* y *Porphyromonas* que el del extracto solo. Véase la figura 1.

El fluorinol, no sólo no interfiere en la acción del extracto de pepitas de uva, sino que potencia de manera sorprendente e inesperada el efecto del extracto de pepitas de uva sobre *Streptococcus* y *Porphyromonas*.

5 Se observa también que el efecto de la asociación extracto de pepitas de uva con NaF disminuye el número de bacterias de 3 log₁₀ como mínimo en *Streptococcus* y *Porphyromonas* que el del extracto solo en el experimento n1 1. Véase la figura 2.

NaF potencia por lo tanto también el efecto del extracto de pepitas de uva sobre *Streptococcus* y *Porphyromonas*.

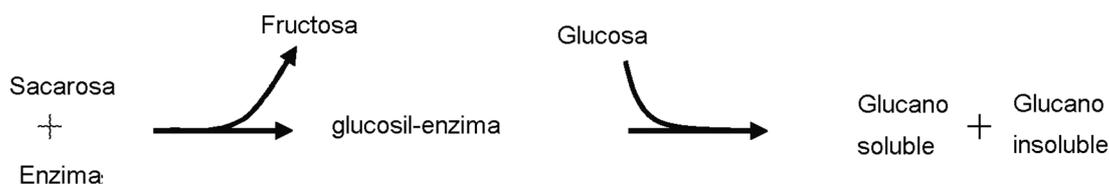
10 Sin embargo, en *Porphyromonas*, el efecto de potenciación del fluorinol es más importante que el de NaF.

3) Inhibición de las glucosiltransferasas (GTF)

3.1) Protocolo

15 Una cepa de *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478 se coloca en 1 litro de medio BHI (caldo corazón-cerebro) enriquecido en glucosa (10 g/l concentración final) en anaerobiosis a 37°C durante 18h. Este medio bacteriano, cuyo pH se ha devuelto a 6,5 con la ayuda de una solución de NaOH 1N, se centrifuga después durante 30 minutos a 8000 rpm, 4°C. La glucosiltransferasa, presente en el sobrenadante, se concentra por precipitación con sulfato de amonio. Éste (50% p/v de saturación) se añade progresivamente al sobrenadante mantenido a 4°C bajo agitación durante 30 minutos. La mezcla se centrifuga después a 8000 rpm, 4°C durante 30 minutos. El residuo, rico en glucosiltransferasa, se recoge después mediante un tampón fosfato-potasio K₂HPO₄ (10 mM, pH 6,5), se dializa (MWC 6-8000; anchura 14,6 mm) durante 16 h y después se congela a -20°C. Esto constituye la solución de GTF purificada.

25



30 Con el fin de evaluar la acción de los diferentes extractos sobre la actividad enzimática de las glucosiltransferasas, se efectúan dos mediciones: la velocidad inicial de reacción por la dosificación del porcentaje de fructosa liberada (dosificación de los azúcares reductores - ensayo con DNS) y la cantidad de glucano insoluble sintetizado (mediciones efectuadas por pesadas).

Los resultados son expresados en porcentajes de inhibición con respecto a soluciones control (agua ultrapura):

- 35
- por un lado, el porcentaje de inhibición de la velocidad inicial de la reacción enzimática (anotada "Fructosa" en la tabla de resultados siguiente)
 - por otro lado, el porcentaje de inhibición de formación del glucano insoluble producido después de 24 horas de incubación a 37°C (señalado como "Glucano insoluble" en la tabla de resultados siguiente).
- 40

La mezcla de reacción siguiente se coloca en un tubo con hemólisis a 37°C:

Glucosiltransferasa	csp 0,1 a 0,4 U/ml
Sacarosa	50 g/l
Tampón fosfato-potasio K ₂ HPO ₄ 100 mM	65 mM, pH 6,5
Azida de sodio	0,1 g/l
Dextrano T10	2 g/l
Polifenoles	0-2000 µg/ml

45 La reacción puede ser provocada (t=0) por adición de sustrato (sacarosa) o de solución enzimática.

Unas soluciones madre de cada extracto a ensayar se preparan por solubilización de los diferentes polvos en agua mQ. En cada experimento, se realizan tres tubos de control (agua mQ) y cada concentración de extracto se ensaya por triplicado.

50 * Dosificación de los azúcares reductores: método con DNS

El dextrano interfiere sobre el conjunto de los métodos colorimétricos de dosificaciones de proteínas, ya que las partículas de dextrano difractan la luz y crean una absorbancia parásita. La cantidad de glucosiltransferasa se mide

por lo tanto por su actividad en condiciones estándares. Una unidad glucosiltransferasa representa la cantidad de enzima que libera un micromol de fructosa por minuto.

5 La actividad se determina por medición de la velocidad inicial de producción de los azúcares reductores (fructosa) con la ayuda del método con ácido dinitro-3,5-salicílico (Sumner y Howell, 1935) con una escala estándar en fructosa (0-2,5 g/l).

10 El ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de color amarillo es reducido por los glúcidos reductores en medio básico en caliente, para formar un complejo de color naranja-rojo: el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. El método presentado permite una dosificación del poder reductor que va hasta el equivalente de 2,5 g/l de fructosa.

15 El reactivo DNS se prepara de la siguiente manera: 150 g de tartrato doble de sodio potásico se disuelven en 250 ml de agua, después se añaden 100 ml de NaOH 2N, después, bajo agitación, se añade 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se añade entonces agua mQ en cantidad suficiente para 500 ml.

20 En los tiempos 0 h y 3 h, se extraen 200 µl de la mezcla de reacción y se introducen tan rápido como sea posible en tubos de hemólisis de vidrio que contienen 200 µl de DNS (detención de la reacción). Los azúcares reductores producidos son entonces medidos con respecto a una escala estándar fructosa (0-2,5 g/l). En paralelo, se realiza un blanco añadiendo 200 µl de agua mQ a los 200 µl de DNS.

Los tubos se cubren con aluminio (DNS sensible a la luz) y después se llevan a 90-100°C en baño maría durante 5 minutos. El conjunto se enfría después rápidamente en hielo durante 5 minutos, se añaden entonces 2 ml de agua mQ en todos los tubos y se lee la absorbancia a 540 nm después de 20 minutos de reposo.

25 La actividad específica se calcula en U/ml de solución de enzima, sabiendo que 1U es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de fructosa por minuto en condiciones estándares.

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{\text{Pendiente curva cinética de dosificación}}{\text{Pendiente curva patrón fructosa}} / 180 \times 1000 \times \text{factor de dilución}$$

30 * Ensayo de la cantidad de glucano insoluble formada

La cantidad de glucano insoluble sintetizada se mide 24 h después del principio de la reacción enzimática. Con el fin de parar la reacción, los tubos son recubiertos con aluminio y después llevados a 90-100°C en baño maría durante 5 minutos. El conjunto se enfría después rápidamente en hielo durante 5 minutos. El medio (2 ml) se centrifuga entonces durante 30 minutos a 15000 rpm, 4°C.

35 El residuo se lava después dos veces con agua ultrapura, se seca durante 24 h a 65°C y después se pesa.

3.2) Resultados y conclusiones

40 El fluorinol solo llega a porcentajes de inhibición de la reacción enzimática inicial del 10,3% y del 20,6% para las concentraciones del 0,68% y el 1,02% respectivamente. Además, a estas dos concentraciones, el fluorinol es ineficaz sobre la síntesis de glucano insoluble.

45 El extracto de pepitas de uva solo al 0,2% conlleva el 43,9% de inhibición de la velocidad inicial de reacción enzimática y el 96,4% de inhibición de formación de glucano insoluble (GI). La adición del 0,68% y del 1,02% de fluorinol a este extracto al 0,2% conlleva mejores porcentajes de inhibición de la velocidad inicial de reacción del 57,4% y del 65,7% respectivamente.

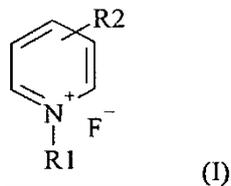
50 Los porcentajes de inhibición de la síntesis de glucano insoluble obtenidos con esta asociación son del 96,1% y del 97,1% respectivamente.

Globalmente, el fluorinol permite por lo tanto potenciar la actividad de inhibición de los GTF del extracto de pepitas de uva.

REIVINDICACIONES

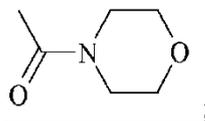
5 1. Asociación de un extracto acuoso de pepitas de uva con por lo menos una sal de flúor para su utilización como composición anti-adhesión de higiene bucal destinada a prevenir y/o disminuir la formación y la acumulación de la biopelícula dental en las superficies dentales o el tejido epitelial gingival, preservando al mismo tiempo el equilibrio de la flora bacteriana bucal.

2. Asociación según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sal de flúor se selecciona de entre las sales que responden a la fórmula (I) siguiente:



en la que:

- 15 * R1 = H, alcoilo;
* R2 = -CH₂-OH, carboxilato de alcoilo, -CO-NH-CH₂-CH₂-OH,



20 y R2 se encuentra en posición 2 o 3.

3. Asociación según la reivindicación 2, caracterizada por que dicha sal de flúor es el fluorhidrato de 3-piridilmetanol.

4. Asociación según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha sal de flúor es el fluoruro de sodio.

25 5. Asociación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que dicho extracto acuoso de pepitas de uva contiene una fracción másica de polifenoles superior al 50%, preferentemente superior al 90%.

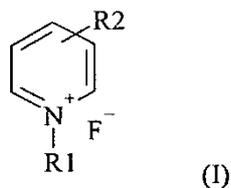
6. Asociación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que dicho extracto acuoso de pepitas de uva contiene una fracción másica de proantocianidinas comprendida entre el 20 y el 50%.

30 7. Asociación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que dicha composición para higiene bucal está destinada a prevenir la formación de sarro o la aparición de enfermedades buco-dentales relacionadas con la acumulación de biopelícula.

35 8. Asociación según la reivindicación 7, caracterizada por que dichas enfermedades buco-dentales se seleccionan de entre la caries, las gingivitis o las periodontitis.

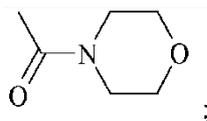
9. Composición anti-adhesión para higiene bucal que comprende una asociación de un extracto acuoso de pepitas de uva y de una sal de flúor.

40 10. Composición según la reivindicación 9, caracterizada por que la sal de flúor se selecciona de entre las sales que responden a la fórmula siguiente:



45 en la que:

- * R1 = H, alcoilo;
* R2 = -CH₂-OH, carboxilato de alcoilo, -CO-NH-CH₂-CH₂-OH,



y R2 se encuentra en posición 2 o 3.

- 5 11. Composición según la reivindicación 10, caracterizada por que dicha sal de flúor es el fluorhidrato de 3-piridilmetanol.
- 10 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada por que se presenta en forma de un enjuague bucal, de un gel dentífrico, de un gel gingival, de una goma de mascar, de una pastilla para chupar, de una cápsula coextruida, de hebras para cepillo de dientes, de un apósito adhesivo, de una toallita impregnada, de una pasta adhesiva para dentaduras postizas y prótesis, o de una pasta profiláctica de pulido.
- 15 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizada por que contiene además siliglicol y/o vitamina E.
- 20 14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizada por que contiene entre 50 µg/ml y 10000 µg/ml, preferentemente entre 200 µg/ml y 5000 µg/ml, aún más ventajosamente entre 1000 µg/ml y 3000 µg/ml y de manera aún más ventajosa aproximadamente 2000 µg/ml de dicho extracto de pepitas de uva.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, caracterizada por que contiene entre 50 ppm y 10000 ppm de flúor, preferentemente entre 500 ppm y 2000 ppm de flúor.

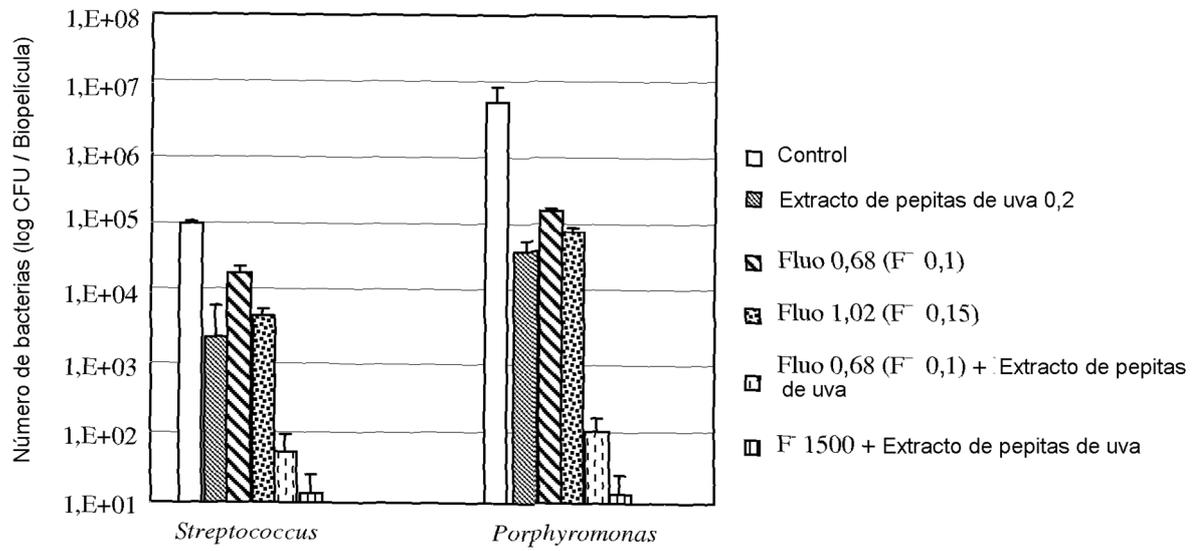


FIGURA 1

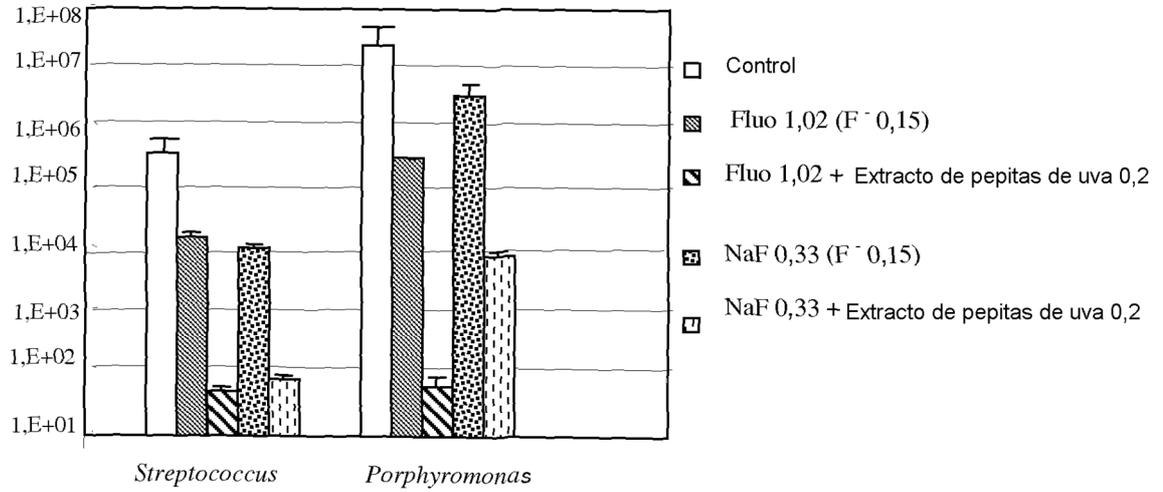


FIGURA 2