

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 801**

51 Int. Cl.:

A61K 31/191	(2006.01)
A61K 31/192	(2006.01)
A61K 31/194	(2006.01)
A61K 31/353	(2006.01)
C12P 7/40	(2006.01)
C12P 7/42	(2006.01)
C12P 7/46	(2006.01)
C12P 7/48	(2006.01)
C12P 17/06	(2006.01)
A61K 36/45	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/EP2013/061852**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182702**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13727233 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2858654**

54 Título: **Extracto de arándano útil en el tratamiento y la prevención de las infecciones urinarias**

30 Prioridad:

07.06.2012 FR 1255324

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

04.04.2017

73 Titular/es:

**DIANA NATURALS (100.0%)
33560 Antrain, FR**

72 Inventor/es:

**SANONER, PHILIPPE;
BOCHARD, VALÉRIE;
CHARISSOU, LUCIE;
LASTIQUE, BÉNÉDICTE;
JACOB, MORGANE y
THOMAS, PATRICE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 607 801 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

Extracto de arándano útil en el tratamiento y la prevención de las infecciones urinarias.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un extracto concentrado de arándano (*Vaccinium macrocarpon*) cuya composición compleja permite aumentar sus efectos antibacterianos, útil para la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias, y en particular para el tratamiento preventivo o antirrecidiva de infecciones urinarias. La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de tal extracto, de composiciones alimenticias, nutracéuticas o farmacéuticas que comprenden el extracto y a su utilización en el tratamiento o la prevención de las infecciones urinarias.

15 **Técnica anterior**

Las infecciones urinarias (UTIs) están entre las enfermedades infecciosas más extendidas, y constituyen un presupuesto de salud considerable para la sociedad. Los microorganismos pueden alcanzar las vías urinarias por vía hematogena o linfática, pero la mayoría de las pruebas clínicas y experimentales muestran que la ascensión de la uretra por los microorganismos constituye la vía más común que conduce a una infección urinaria, en particular por los organismos de origen entérico (*Escherichia coli* y otras enterobacterias). Esto proporciona una explicación lógica para la mayor frecuencia de las infecciones urinarias en las mujeres que en los hombres y para el riesgo incrementado de infección tras el cateterismo de la vejiga o de la instrumentación.

Basándose en la utilización tradicional de arándano (*Vaccinium macrocarpon*, también denominado "arándano de américa" o "gran arándano rojo de América", o también "atoca" o "ataca" en Québec, en inglés "cranberry" o "American cranberry"), se utilizan numerosos ingredientes procedentes de fruto o zumo en el mercado de los complementos alimenticios como agente curativo o preventivo que permite limitar el riesgo de aparición de infecciones urinarias. Se han demostrado unos vínculos epidemiológicos y clínicos entre el consumo de arándano de América y la aparición de infecciones urinarias.

El arándano es un arbusto de pequeño tamaño (no más de 30 cm) que crece espontáneamente únicamente en el Este de América del Norte desde las Carolinas hasta Canadá. Su presencia caracteriza las turberas ácidas. El fruto es una pequeña baya que mide de 10 a 20 mm de diámetro. En su madurez, su coloración es rojo vivo y su sabor acidulado y astringente.

La baya de arándano se caracteriza por su riqueza en flavonoides y comprende numerosos tipos de compuestos diferentes, incluyendo:

- 40 - unos ácidos orgánicos, y en particular el ácido quínico, el ácido cítrico, el ácido málico y los ácidos fenólicos tales como los ácidos benzoicos, hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos,
- unos antocianos (también denominados "antocianósidos"),
- 45 - unos flavanoles, y en particular:
 - o unos flavan-3-ol monómeros tales como la catequina, la epicatequina, la galocatequina, y la epigalocatequina,
 - o unos flavan-3-oles polímeros, los proantocianidoles (también denominados "proantocianidinas" (inglés) o "taninos condensados"),
 - 50 - unos galotaninos y elagitaninos (también denominados taninos hidrolizables),
 - unos flavonoles, como la quercetina por ejemplo, en forma glicosilada y/o aglicona.

El arándano comprende diferentes ácidos orgánicos, tales como el ácido quínico, el ácido cítrico o el ácido málico. Durante mucho tiempo, el efecto del consumo de zumo de arándano se ha considerado como relacionado con una acidificación de la orina que permite limitar el crecimiento de las bacterias uropatógenas disminuyendo el pH urinario.

60 Así, el documento US 010/028456 describe una composición para tratar las infecciones urinarias, que comprende una formulación de timoquinona y de frutos, zumos o extractos de arándano. Un extracto de arándano susceptible de ser utilizado es un extracto a 5:1 estandarizado para tener un contenido en ácido quínico del 3,4% (el resto de su composición no se especifica). Sin embargo, se recuerda en la introducción que la eficacia terapéutica de los extractos de arándano para el tratamiento de las infecciones urinarias no se ha demostrado.

En efecto, el mecanismo de acción relacionado con una acidificación de la orina es demasiado simplificador, siendo estos ácidos orgánicos en realidad metabolizados *in vivo* y por lo tanto no alcanzan intactos las vías urinarias. Así, a pesar de que las células humanas no metabolizan el ácido quínico, el material enzimático de la flora intestinal permite reducir el ácido quínico en ácido benzoico a nivel del colon.

5 Entre los ácidos orgánicos, el arándano está particularmente concentrado en diferentes ácidos fenólicos, incluyendo los ácidos benzoicos, hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. Contiene así 0,05 g/100 g de ácido hidroxibenzoico (esencialmente representados por el ácido benzoico), y menos de 0,1 g/100 g de ácidos hidroxicinámicos representados esencialmente por los ácidos p-cumárico, sinápico y cafeico. Comprende también otros ácidos orgánicos como los ácidos fenólicos, y en particular el ácido quínico, que es un intermediario de la síntesis del núcleo benzénico mediante la vía shikimato (4-hidroxibenzoico), que permite la síntesis de los aminoácidos aromáticos, de los fenil-propanoides y compuestos fenólicos ácidos hidroxicinámicos y flavonoides.

15 Los ácidos fenólicos, y más particularmente los más apolares de ellos (tal como el ácido benzoico) interrumpen las posibilidades de intercambios metabólicos de los transportadores de las membranas bacterianas y tienen por lo tanto un efecto bactericida.

20 Sin embargo, los ácidos fenólicos son biodisponibles y fácilmente transportados a través de la barrera intestinal del intestino delgado a través de los transportadores de los carboxilatos (Cong *et al.*, 2001) y, una vez en circulación enterohepática, se conjugan después con glicina para formar el ácido hipúrico, para finalmente ser excretados en la orina por los riñones. La actividad bactericida del ácido hipúrico es menos importante que la de los ácidos fenólicos. La actividad antibacteriana directamente aportada por los ácidos fenólicos del arándano es por lo tanto, en este caso, potencialmente disminuida por su biodisponibilidad en el intestino delgado.

25 En consecuencia, los efectos de los ácidos orgánicos, tales como el ácido quínico y los ácidos fenólicos, sobre la prevención o la disminución de la aparición de infecciones urinarias no son completamente claros.

30 Desde hace algunos años, el interés por el arándano en la prevención de las infecciones urinarias se focalizó en los compuestos de tipo proantocianidoles (también denominados "proantocianidinas" o "taninos condensados", abreviados en "PAC" en la presente descripción).

Las PAC son unos polímeros de unidades flavanoles (tales como la catequina, la epicatequina, la galocatequina y la epigalocatequina), que pueden estar unidas entre sí de diferentes maneras.

35 En particular, se han descrito dos tipos de enlaces:

- unos enlaces de tipo A, en los que las dos unidades flavanol están unidas por dos enlaces covalentes, uno entre el carbono C-4 de la primera unidad flavanol y el carbono C-8 de la segunda unidad flavanol (C-4 → C-8), siendo el otro un enlace éter entre el carbono C-2 de la primera unidad flavanol y el carbono C-7 de la segunda unidad flavanol (C-2 → O → C-7). La presencia de PAC con este tipo de enlace es una de las características del arándano, presentando pocos vegetales unas PAC con este tipo de enlace.

45 - unos enlaces de tipo B, en los que las dos unidades flavanol están unidas por un único enlace covalente, entre el carbono C-4 de la primera unidad flavanol y el carbono C-6 o C-8 de la segunda unidad flavanol (unión C-4 → C-6 o C-4 → C-8), estos enlaces están también presentes en las PAC de arándano.

50 Las PAC de arándano comprenden al mismo tiempo unos enlaces de tipo A y de tipo B y son particularmente polimerizadas, con un grado de polimerización medio de 15 unidades en la fruta (Gu *et al.*, 2002), es decir un 80% de proantocianidoles con un grado de polimerización superior a 5, y que comprende un 46% de enlaces interflavánicos de tipo A.

55 El interés por las PAC de arándano proviene del hecho de que se ha demostrado *in vitro* que estos compuestos son capaces, como la mayoría de los taninos, de interactuar con las paredes de las células del tracto urinario y/o con los componentes extracelulares de las bacterias que limitan sus posibles interacciones, y por lo tanto potencialmente la fijación o la adhesión de las bacterias sobre las paredes de las vías urinarias. Este efecto curtierte se supone que explica, por lo tanto, que tiene un efecto sobre la aparición y la persistencia de las bacterias uropatógenas que colonizan el tracto urinario.

60 Así, la patente EP 0 752 871 B1 describe unos extractos de una planta del género *Vaccinium* (en particular de arándano) enriquecidos en una fracción que tiene unos efectos antiadhesión sobre las bacterias y desprovisto de azúcares simples o diméricos, en ácidos y en antocianos, purificado por cromatografía, en particular con la ayuda de una columna lipófila. La fracción que tiene unos efectos antiadhesión sobre las bacterias corresponde principalmente a las PAC.

65 De manera similar, la solicitud WO 96/30033 describe unas PAC particulares que tienen un grado de polimerización de entre 2 y 18 y su utilización para la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias a través de un efecto

- anti-adhesión de las bacterias. Estas PAC son susceptibles de ser purificadas a partir de arándano (véase el ejemplo 1), por un procedimiento que comprende la alcalinización del arándano a un pH superior a 10 para ionizar los grupos fenol de los compuestos polifenólicos en grupos fenóxidos, la precipitación con metanol, la reacidificación del producto obtenido para reconvertir los grupos fenóxidos en fenoles, y su purificación sobre una columna lipófila. El extracto obtenido comprende unas PAC y unos flavonoides. A partir del procedimiento de preparación (utilización de una columna lipófila en particular), este extracto no comprende cantidades significativas de ácidos orgánicos, tales como el ácido quínico o los ácidos fenólicos (pero sólo eventualmente unas cantidades bajas residuales, ampliamente inferiores al 5% en peso con respecto al peso total del extracto seco).
- La patente EP 1 014 969 B1 describe un extracto de PAC de plantas (en particular de arándano) que tiene un efecto antiadhesión de bacterias particulares sobre unas superficies. Dicho extracto contiene uno o varios proantocianidoles con de 5 a 6 unidades, de las cuales al menos dos están unidas por un enlace de tipo A. Este extracto se puede obtener por un procedimiento que comprende una extracción por un disolvente acuoso, una etapa de purificación por cromatografía con una columna lipófila o por extracción con un disolvente no polar, y una segunda etapa de purificación por cromatografía con una columna hidrófilo-lipófila. El extracto obtenido comprende unas PAC, pero está desprovisto en particular de azúcares, de ácidos orgánicos, de antocianos y de flavonoles.
- La solicitud EP 2 108 268 A1 describe la preparación de un extracto de arándano fuertemente enriquecido en PAC de arándano de grado de polimerización superior a 5 y su utilización para disminuir la fijación de ciertas bacterias *E. coli* sobre las paredes de las vías urinarias. El extracto se obtiene mediante un procedimiento que comprende una extracción por un disolvente orgánico (en particular un alcohol) de las fracciones insolubles obtenidas a partir de bayas de arándano. Comprende al menos un 15% en peso de PAC expresado en equivalente procianidina C1 con respecto al peso seco del extracto, una cantidad de antocianos similar a la de la baya de arándano, unos flavonoles, y unos restos de azúcares, de proteínas, de fibras y de materias minerales. Obteniéndose a partir de fracciones insolubles de arándano, no comprende sin embargo ninguna cantidad significativa de ácidos orgánicos, tales como el ácido quínico o los ácidos fenólicos (pero sólo eventualmente unas cantidades bajas residuales, ampliamente inferiores al 5% en peso con respecto al peso total del extracto seco).
- La solicitud WO 2010/121203 describe un extracto de arándano destinado a reducir la contaminación bacteriana en bebidas, que comprende unas PAC y unos antocianos, pero que comprende unas cantidades residuales muy limitadas en azúcares y ácidos orgánicos debido a una etapa de purificación sobre una resina que fija los compuestos fenólicos, pero que no se une de manera sustancial a los azúcares y a los ácidos orgánicos. La descripción general indica que la cantidad residual de azúcares o de ácidos orgánicos es, en todo caso, inferior al 5%, y los ejemplos de extracto caracterizados en la parte experimental comprenden todos menos del 1% de azúcares y de ácidos orgánicos residuales.
- Unos efectos bactericidas y bacterioestáticos de las PAC de arándano también se han puesto en evidencia *in vitro* (Sanchez-Patan *et al.*, 2012).
- El documento EP 2 033 641 A1 describe un procedimiento de preparación de extractos ricos en PAC, en particular a partir de arándano, susceptibles de tener unos efectos antibacterianos, en particular en el ámbito de infecciones urinarias. El procedimiento descrito y reivindicado implica una etapa de lavado con agua desmineralizada de la resina utilizada para enriquecer el extracto en PAC, que conduce a la eliminación de los azúcares y de los ácidos fenólicos. Además, se describe también una etapa opcional que tiene como objetivo eliminar las antocianidinas. El procedimiento descrito pretende por lo tanto también, en primer lugar, enriquecer al máximo el extracto en PAC, en detrimento de los otros compuestos activos contenidos en el arándano.
- Así, se ha considerado generalmente estos últimos años que el efecto positivo del consumo de arándano sobre la prevención de las infecciones urinarias estaba relacionado con los efectos anti-adhesión, bacterioestáticos y bactericidas de las PAC comprendidas en el arándano.
- Sin embargo, las PAC resultan poco biodisponibles en su forma de PAC natural, y sólo una baja proporción de PAC parece superar la barrera intestinal tal cual (Appeldoorn *et al.*, 2009). Las PAC parecen además tanto menos biodisponibles cuando su grado de polimerización es elevado (Pu *et al.*, 2012). Así, la mayoría de las PAC de arándano permanece en el lumen intestinal que atraviesa el intestino delgado para alcanzar el colon. A este nivel, las PAC débilmente polimerizadas se hidrolizan en forma de ácidos fenólicos y resultan biodisponibles en esta forma.
- En consecuencia, si los efectos antiadhesión, bacterioestáticos y bactericidas de las PAC típicas del arándano se demuestran *in vitro*, no pueden tener lugar de manera mayoritaria en la vejiga o el tracto urinario, siendo una muy baja proporción de estos compuestos susceptibles de alcanzar las vías urinarias. Por el contrario, estos efectos son posibles en el colon, pero no está claro si se pueden explicar para ellos mismos el efecto positivo del consumo de arándano sobre la prevención de las infecciones urinarias.
- Por lo tanto, es difícil, a partir de la técnica anterior, determinar qué componentes de la baya de arándano entera permiten evitar o disminuir la aparición de infecciones urinarias.

5 En el contexto de la presente invención, los inventores han elaborado un nuevo extracto de arándano que, en lugar de focalizarse sobre un tipo de componente particular (PAC, ácidos fenólicos, ácidos orgánicos) susceptible de poseer un efecto antibacteriano, incorpora en un único extracto unas fracciones enriquecidas de cada uno de estos componentes. Además, el extracto según la invención es un extracto desesterificado, es decir que se ha sometido, en una etapa o en otra, a un tratamiento enzimático por unas esterasas, lo que tiene por efecto aumentar la concentración en compuestos de interés y hacer el extracto más fermentable.

10 El extracto según la invención posee por lo tanto la ventaja de ser altamente concentrado en compuestos de interés con respecto a la baya de arándano, y combinar diferentes mecanismos de prevención o de disminución de la aparición de infecciones urinarias.

Descripción de la invención

15 La presente invención se refiere por lo tanto a un extracto de arándano, que comprende:

- del 5 al 20% en peso, ventajosamente del 10 al 15% en peso, de proantocianidoles (PAC) con respecto al peso total del extracto seco (medido mediante el método de BL-DMAC),
- 20 - del 2 al 12% en peso, ventajosamente del 3 al 10% en peso, ventajosamente de manera estricta más del 5% y menos del 10% en peso, de ácidos orgánicos con respecto al peso total del extracto seco, incluyendo:
 - o del 1 al 5% en peso, ventajosamente del 1 al 3% en peso de ácido quínico con respecto al peso total del extracto seco,
 - 25 o del 0,5 al 8% en peso, ventajosamente del 1 al 4% en peso, de ácidos fenólicos con respecto al peso total del extracto seco,
- al menos el 0,5% en peso, ventajosamente al menos el 1% en peso, de antocianos y/o de anticianidoles con respecto al peso total del extracto seco,
- 30 - del 1 al 10%, ventajosamente del 1 al 5% en peso, en peso de azúcares con respecto al peso total del extracto seco,
- 35 - del 1 al 10% en peso, ventajosamente del 2 al 5% en peso, de flavonoles, con respecto al peso total del extracto seco.

40 En una forma de realización preferida de la presente invención, el extracto de arándano está además desesterificado.

Por "arándano", se entiende la planta *Vaccinium macrocarpon*, también denominada "arándano de américa" o "gran arándano rojo de América", o también "atoca" o "abaca" en Québec, en inglés "cranberry" o "American cranberry"). Para simplificar, se utiliza generalmente el término "arándano" en la presente descripción.

45 Por "desesterificado" se entiende que el extracto ha sufrido, durante su procedimiento de preparación, una etapa de tratamiento enzimática mediante al menos una enzima de tipo "esterasa" que puede hidrolizar algunos enlaces éster seleccionada entre las tanasas (en particular las galoil-estearas y las elagi-estearasas), las cinamoil-esterasas, las β -glucosidasas y sus mezclas. Este tratamiento tiene por efecto aumentar la fermentabilidad intestinal del extracto según la invención, hidrolizando, al menos parcialmente, algunos compuestos complejos presentes en el arándano. Ventajosamente, se puede utilizar una mezcla que comprende unas actividades tanasa, cinamol-esterasa y β -glucosidasa.

50 Por "tanasa" se entiende una enzima capaz de hidrolizar la unión éster entre el azúcar y los ácidos gálicos o elágicos de los galotaninos y elagitaninos. En particular, en la nomenclatura EC (siendo EC la sigla de "Enzyme Commission numbers", la comisión de las enzimas, que ha definido una clasificación numérica de las enzimas, basada en la reacción química que catalizan), las tanasas llevan el nº EC 3.1.1.20, y permiten catalizar las reacciones siguientes:

- digalato + H₂O = 2 galato,
- 60 - elagitaninos + H₂O = ácido hexahidroxifénico + ácido gálico,
- (+/-)-epicatequina-galato + H₂O = epicatequina + ácido gálico,
- (+/-)-epigalocatequin-3-galato + H₂O = epigalocatequina + ácido gálico,
- 65 - (-)-epigalocatequina galato + H₂O = (-)-epigalocatequina + ácido gálico,

- 1,2,3,4,6-pentagalatoil glucosa + H₂O = 5 galato + D-glucosa,
- ácido tánico + H₂O = 10 galato + D-glucosa,
- propilgalato + H₂O = galato + propanol,
- éster etílico del ácido protocatequico + H₂O = protocatecuato + etanol.

5

10 Cuando se utilizan las tanasas, el tratamiento tiene por efecto en particular hidrolizar los galotaninos y los elagitaninos del arándano en azúcares y ácido gálico o ácido elágico respectivamente, dos ácidos fenólicos naturalmente poco o nada presentes en forma libre en el arándano. Tales enzimas están disponibles comercialmente en diferentes proveedores tales como:

- 15 - AB Enzymes GmbH, Feldbergstrasse 78, 64293 Darmstadt, Germany: (Rohapect 10L; Rohament CL; Rohalase BX/BXL; Endozym B-Split)
- Biocatalysts Ltd, Cefn Coed, Parc Nantgarw, Cardiff, CF15 7QQ, Wales, UK: (Depol 670L, Depol 40, Depol 793L; Cellulase 13L, Tannase 795P)
- 20 - Novozymes A/S, Krogshoejvej 36,2880 Bagsvaerd, Dinamarca: (Pectinex BE-3L; Pectinex Ultra SP-L)

25 Por "β-glucosidasas" se entiende una enzima capaz de hidrolizar una glucosa no reducida terminal, unida a una aglicona por un enlace β, con liberación de D-glucosa. En la nomenclatura EC, las β-glucosidasas llevan el nº EC 3.2.1.21, y permiten catalizar las reacciones:

- antocianidina-glucósido + H₂O = antocianidina + glucosa con la parte antocianidina: cianidina, petunidina, malvidina, peonidina,
- 30 y con la parte glucósido: glucosa, galactosa, arabinosa principalmente,
- quercetina-3,4'-di-beta-D-glucopiranosido + H₂O quercetina + beta-D-glucosa,
- quercetina-4'-beta-D-glucopiranosido + H₂O quercetina + beta-D-glucosa,
- 35 - quercetina-7-O-beta-D-glucósido + H₂O quercetina + beta-D-glucosa.

40 Tales enzimas están disponibles comercialmente en diferentes proveedores, en particular en los mencionados anteriormente en lo referente a las tanasas.

Por "cinamol-esterasa" se entienden las enzimas que lleva los nº EC 3.1.1.42 y EC 3.1.1.73 en la nomenclatura EC, y capaces de catalizar las reacciones siguientes:

- 45 - EC 3.1.1.42 - clorogenato hidrolasa:
 - ácido clorogénico + H₂O = ácido cafeico + ácido quínico,
 - ácido 5-O-cafeoil quínico + H₂O = ácido cafeico + ácido quínico;
- 50 - EC 3.1.1.73 - feruloil esterasa:
 - éster metílico del ácido ferúlico + H₂O = ácido ferúlico + metanol,
 - 5-O-(trans-feruloil)-L-arabinofuranósido + H₂O = ácido ferúlico + L-arabinosa,
 - 55 - ácido 5-O-p-cumaroilquínico + H₂O = ácido p-cumárico + ácido quínico.

60 Tales enzimas están disponibles comercialmente en diferentes proveedores, y en particular en los mencionados anteriormente referente a las tanasas.

El tratamiento enzimático por al menos una esterasa permite por lo tanto también aumentar la concentración del extracto, en particular en ácidos orgánicos y en ácidos fenólicos libres. Las enzimas descritas anteriormente podrán ser utilizadas a lo largo de la cadena de producción en cantidades variables generalmente del 0,05% al 0,1% de la materia seca de arándano utilizada.

65 Ventajosamente, el tratamiento enzimático por al menos una enzima de tipo "esterasa" capaz de hidrolizar algunos

enlaces éster, seleccionada entre las tanasas (en particular las galoi-esterasas y las elagi-esterasas), las cinamoil-esterasas, las β -glucosidasas y sus mezclas, se ha realizado simultáneamente o después de un tratamiento por unas enzimas de licuefacción (pectinasa, poligalacturonasa, celulasa) que tiene principalmente por objetivo:

- 5 - distinguir unas fracciones fenólicas hidrolizables de fracciones resistentes a la hidrólisis,
- hacer estos compuestos más apolares y en consecuencia más fácilmente separables.

10 Algunas preparaciones que comprenden unas enzimas de licuefacción (pectinasa, poligalacturonasa, celulasa) pueden comprender minoritariamente unas actividades secundarias de tipo celobiasa (β -glucosidasa), galactosidasa, arabinosidasas, xilanasas, incluso unas actividades secundarias de tipo tanasa, cinamoil-esterasa, y/o β -glucosidasa, susceptibles de conducir a una desesterificación muy limitada de los polifenoles de arándano. Sin embargo, la etapa de licuefacción enzimática no permite obtener una desesterificación significativa del extracto, que puede ser obtenida sólo mediante una etapa suplementaria de tratamiento enzimático específico por al menos una esterasa seleccionada entre las tanasas (en particular las galoi-esterasas y las elagi-esterasas), las cinamoil-esterasas, las β -glucosidasas y sus mezclas. En consecuencia, un extracto de arándano que ha sufrido una simple etapa de licuefacción enzimática con la ayuda de una composición que comprende muy mayoritariamente unas enzimas de licuefacción de tipo pectinasa, poligalacturonasa, y celulasa, sin adición suplementaria de al menos una esterasa seleccionada entre las tanasas (en particular las galoi-esterasas y las elagi-esterasas), las cinamoil-esterasas, las β -glucosidasas y sus mezclas, no se considerará como un extracto desesterificado en el sentido de la invención.

25 Por "proantocianidoles", "proantocianidinas" o "taninos condensados" abreviados por "PAC", se entienden los oligómeros o polímeros de flavanoles de arándano. El término "oligómero" agrupa los dímeros y trímeros de flavanoles, el término "polímero" agrupa los multímeros de flavanoles que tienen un grado de polimerización (DP) de por lo menos 4. El extracto desesterificado de arándano según la invención comprende al mismo tiempo unos oligómeros y unos polímeros de PAC, en una proporción global del 5 al 20% en peso, ventajosamente del 10 al 15% en peso, de PAC con respecto al peso total del extracto seco. Dentro de las PAC totales, los polímeros de PAC (DP \geq 4 que representan al menos el 30% en peso, con respecto al peso de todos las PAC presentes en el extracto.

30 Los polímeros de PAC son muy poco biodisponibles *in vivo* y permanecen en su mayoría en el lumen intestinal que atraviesa el intestino delgado para alcanzar el colon, en el que son susceptibles de tener un efecto anti-adhesión, bactericida y bacterioestático sobre las bacterias entéricas susceptibles de migrar hacia la uretra y dar lugar a infecciones urinarias. La presencia de polímeros de PAC en el extracto según la invención contribuye por lo tanto a su eficacia de prevención o de disminución de las infecciones urinarias.

35 Los oligómeros de PAC son también poco biodisponibles *in vivo* y llegan en su mayoría hasta el colon, en el que son hidrolizados en forma de ácidos fenólicos. Éstos, y en particular los más apolares de ellos tales como el ácido benzoico, pueden entonces ejercer otro tipo de efecto bacteriano, por perturbación de las posibilidades de intercambios metabólicos de los transportadores de las membranas bacterianas.

40 El extracto según la invención comprende también del 2 al 12% en peso, ventajosamente de 3 al 10% en peso, ventajosamente estrictamente más del 5% y menos del 10% en peso, de ácidos orgánicos con respecto al peso total del extracto seco. Por "ácido orgánico" se entiende cualquier compuesto hidrocarbonado (saturado o insaturado) que comprende al menos una función ácida. Así, los ácidos orgánicos de arándano presentes en el extracto según la invención incluyen:

- 45 - unos ácidos fenólicos, en una cantidad del 0,5 al 8% en peso, ventajosamente del 1 al 4% en peso, con respecto al peso total del extracto seco.

50 El extracto según la invención comprende en particular los principales ácidos fenólicos presentes naturalmente en el arándano: el ácido p-cumárico, el ácido sinápico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico, así como otros ácidos fenólicos presentes en menor cantidad en el arándano: ácido orto-hidroxi-cinámico, ácido para-hidroxigenil-acético, ácido ftálico, y ácido elágico.

55 Además, cuando el extracto ha sufrido una etapa de tratamiento por al menos una esterasa, las cantidades de algunos ácidos fenólicos tales como los ácidos gálico, elágico, p-cumárico, ferúlico y cafeico libres aumentan con respecto a un extracto que no ha sufrido este tipo de tratamiento.

60 Los ácidos fenólicos, que son capaces de pasar la barrera intestinal, se conjugan después normalmente con glicina para formar el ácido hipúrico (que posee un poder bactericida menor), antes de su excreción en la orina. Sin embargo, debido a cantidades bastante importantes de ácidos fenólicos presentes en el extracto según la invención (y en particular en un extracto desesterificado que ha sufrido un tratamiento enzimático por unas esteratas), no es imposible que las capacidades de conjugación con la glicina por el hígado sean saturadas y que una parte de los ácidos fenólicos, no conjugados a la glicina, puedan alcanzar la orina, y ejercer sus efectos bactericidas de manera preventiva o curativa. La presencia en el extracto de diferentes

precursores de ácidos fenólicos (en particular el ácido quínico, que puede ser transformado en ácido benzoico por aromatización reductora; los oligómeros de PAC, que son hidrolizados en forma de ácidos fenólicos en el colon; y los antocianos o antocianidoles hidrolizados en forma de ácidos benzoicos en el colon) contribuye también a la presencia en el organismo de una concentración elevada y sostenida en ácidos fenólicos, y por lo tanto a una saturación de las capacidades de conjugación con la glicina por el hígado.

- otros ácidos orgánicos naturalmente presentes en el arándano, en particular el ácido quínico, el ácido cítrico, y el ácido málico.

El extracto según la invención comprende en particular del 1 al 5% en peso, ventajosamente del 1 al 3% en peso de ácido quínico con respecto al peso total del extracto seco.

El ácido quínico se reduce en ácido benzoico (un ácido fenólico) a nivel del colon por el material enzimático de la flora intestinal. El ácido benzoico así obtenido a nivel del colon no se metaboliza y puede por lo tanto ejercer sus efectos bactericidas sobre las bacterias presentes en el colon y susceptibles de migrar en la uretra y causar una infección urinaria.

En consecuencia, la presencia en el extracto según la invención (y en particular en un extracto desesterificado que ha sufrido un tratamiento enzimático por una esterasas) de una cantidad no despreciable de ácido quínico contribuye por un tercer mecanismo al poder de prevención o de disminución de las infecciones urinarias del extracto según la invención.

El extracto según la invención comprende también al menos el 0,5% en peso, ventajosamente al menos el 1% en peso, de antocianos y/o de antocianidoles con respecto al peso total del extracto seco. Por "antocianidol" o "antocianidina", se entiende una subclase de los flavonoides, cuya estructura de base está formada por dos núcleos aromáticos A y B unidos por 3 carbonos que forman, con el oxígeno, el anillo C. Los seis antocianidoles más habituales son: la cianidina, la delphinidina, la pelargonidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina, construidos sobre el mismo esqueleto *Flavylium* responsable del color del compuesto, como se indica en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1: estructura de seis antocianidoles más habituales.

Nombre	Estructura	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷
Cianidina		-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delfinidina		-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Pelargonidina		-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidina		-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidina		-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidina		-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH

Por "antocianos" o "antocianosidos" (o también "antocianinas" en el modelo inglés), se entienden unos heterósidos de antocianidoles, es decir unos antocianidoles que llevan unos azúcares. La parte osídica de los antocianósidos puede ser un monosacárido (glucosa, galactosa, ramnosa), un diholósido (rutinosa constituido de una glucosa unida a una ramnosa, xiloglucosa) o a veces un triholósido. La mayoría de los antocianósidos son unos 3-monósidos y unos 3,5-diósidos de antocianidoles. Existen también unos diósidos unidos en 3, 7 y unos triósidos unidos en 3, 5, 3'. Numerosos antocianósidos son, además, acilados por:

- unos ácidos hidroxicinámicos: ácidos 4-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico,
- unos ácidos benzoicos: ácido gálico,
- unos ácidos alifáticos carboxílicos: ácido acético, o unos ácidos dicarboxílicos como los ácidos malónico, málico, oxálico, succínico.

Estos ácidos esterifican un hidroxilo de azúcar, generalmente en su C-6.

Cuando el extracto no se ha desesterificado, comprende principalmente unos antocianos. Por el contrario, cuando el extracto se ha desesterificado, comprende principalmente unos antocianidoles.

Los antocianos, y más particularmente los antocianidoles (presentes principalmente cuando el extracto está desesterificado), han demostrado tener también unas actividades bactericidas (Pratt *et al.*, 1960). Además, son también fermentados por la flora intestinal, conduciendo a nivel del colon a su transformación en ácidos fenólicos, y en particular en ácido benzoico (Keppler *et al.*, 2005). Estos compuestos son por lo tanto también unos precursores de ácidos fenólicos *in vivo*.

El extracto según la invención comprende además del 1 al 10%, ventajosamente del 1 al 5% en peso de azúcares residuales con respecto al peso total del extracto seco. Esto representa una fuerte disminución del contenido en azúcares con respecto a la baya de arándano, en la que los azúcares representan aproximadamente del 45 al 67% (Blumenthal *et al.*, 2003) en peso de azúcares con respecto al peso total del extracto seco. Los azúcares presentes incluyen en particular glucosa, fructosa, sacarosa, sorbitol.

El extracto según la invención comprende también del 1 al 10% en peso, ventajosamente del 2 al 5% en peso, de flavonoles, tales como la quercetina, en forma glicosilada y/o aglicona, con respecto al peso total del extracto seco.

Así, el extracto según la invención posee una composición compleja, que permite acumular varios efectos antibacterianos a nivel del colon (efectos antiadhesión, bactericida y bacterioestático a través de los polímeros de PAC presentes en el colon, efectos bactericidas de los de los ácidos fenólicos generados a nivel del colon a partir de los oligómeros de PAC y del ácido quínico), uniéndose estos efectos para conferir al extracto según la invención un fuerte poder de prevención o de disminución de la aparición de las infecciones urinarias.

Además, la presencia de ácidos fenólicos en cantidades importantes permite potencialmente, mediante una saturación de las capacidades del hígado, conjugar los ácidos fenólicos con la glicina, un efecto bactericida directo a nivel de las vías urinarias, de manera preventiva o curativa.

El extracto según la invención puede presentarse en diferentes formas, en particular en forma de disolución, o bien en forma seca. Ventajosamente, el extracto según la invención es un extracto seco. En forma de polvo, éste puede ser utilizado bajo diferentes formas, permitiendo por ejemplo preparar comprimidos, cápsulas, gránulos y soluciones bucodispersables. En forma sólida o líquida puede también permitir formular geles, cremas, jabones para aplicaciones tópicas, y formular unas bebidas diluidas para ser reconstituidas o listas para el uso.

El extracto según la invención se puede preparar mediante un procedimiento según la invención que comprende las etapas siguientes:

- a) enriquecimiento de una fracción hidrosoluble de arándano en compuestos polifenólicos apolares (antocianos, antocianidoles, y oligómeros de PAC) por un lado y en ácidos orgánicos, por otro lado, para obtener una fracción I,
- b) enriquecimiento de una fracción no-hidrosoluble de arándano en polímeros de PAC particularmente curtientes con unos grados de polimerización media superior a 6-7 de tipo B y que comprende siempre al menos una unión de tipo A, para obtener una fracción II,
- c) montaje de las fracciones I (rica en compuestos polifenólicos apolares y en ácidos orgánicos) y II (rica en polímeros de PAC) obtenidas respectivamente en las etapas a) y b), en proporciones que corresponden a una relación en peso (fracción I/fracción II) comprendida entre 20/80 y 80/20, y
- d) digestión enzimática por al menos una esterasa seleccionada entre las tanasas (en particular las galoil-esterasas y las elagi-esterasas), las cinamol-esterasas, las β -glucosidasas y sus mezclas.

En el procedimiento según la invención, el extracto se prepara a partir de la combinación de dos fracciones I y II, obtenidas respectivamente a partir de fracciones hidrosolubles (para la fracción I) y no-hidrosoluble (para la fracción II) de arándano.

Estas fracciones hidrosolubles y no hidrosolubles de arándano pueden ser obtenidas a partir de bayas de arándano enteras, por:

- i) molienda de bayas de arándano enteras,
- ii) decantación y separación de las fracciones hidrosolubles y no hidrosolubles.

Las bayas de arándano enteras pueden ser frescas, secas o congeladas (preferentemente mediante un

procedimiento de congelación individual rápido denominado "IQF" (por "Individually Quick Frozen"). Después se muelen mediante técnicas clásicas (etapa i)). En esta etapa, la molienda se somete preferentemente a una etapa de licuefacción enzimática (etapa i1)). Esta etapa es una clásica bien conocida por el experto en la materia, durante la cual unas pectinasas, poligalacturonasas y/o celulasas se añaden al molido con el fin de licuarlo. El molido, preferentemente licuado, se somete después a una etapa de decantación y de separación de las fracciones hidrosolubles y no hidrosolubles (etapa ii)). Esta etapa se realiza ventajosamente a un pH comprendido entre 2 y 7, a una temperatura comprendida entre 15 y 70°C, y a una presión comprendida entre 1 y 15 atmósferas.

De manera alternativa, se puede utilizar directamente como fracción hidrosoluble un zumo de arándano, es decir una fracción líquida de arándano obtenida por prensado de bayas de arándano. El zumo puede además ser un zumo concentrado. Éste se ha sometido preferentemente a una etapa de licuefacción enzimática por al menos una pectinasa, poligalacturonasa, celulasa y sus mezclas.

Asimismo, se puede utilizar directamente como fracción no hidrosoluble un hollejo de arándano. Por "hollejo de arándano" u "orujo de arándano" se entiende el residuo húmedo o secado de bayas de arándano prensadas. Éstas se han sometido preferentemente a una etapa de licuefacción enzimática por al menos una pectinasa, poligalacturonasa, celulasa y sus mezclas.

En el procedimiento según la invención, las fracciones hidrosolubles y no hidrosolubles se tratan separadamente (etapa a) para la fracción hidrosoluble, etapa b) para la fracción no hidrosoluble). Estos tratamientos separados se pueden realizar en un orden cualquiera (etapa a) y después etapa b), etapa b) y después etapa a), o tratamiento simultáneo en paralelo de las dos fracciones).

En la etapa a), la fracción hidrosoluble está enriquecida en compuestos polifenólicos apolares, por un lado, y en ácidos orgánicos, por otro lado, para obtener una fracción denominada "fracción I". Este enriquecimiento se realiza mediante dos etapas sucesivas de purificación, seguidas de una etapa de montaje que conduce a la fracción I:

- en una 1ª etapa a1), los compuestos apolares (y en particular los compuestos fenólicos apolares, como los flavanoles, flavonoles y los antocianos, eventualmente desesterificados) son separados de los compuestos polares (tales como los azúcares y los ácidos) por adsorción de la fracción hidrosoluble sobre un soporte apolar. El lavado por un disolvente polar permite recoger los compuestos polares no adsorbidos sobre el soporte (fracción denominada "fracción polar Ia"). Una etapa de elución por un disolvente apolar permite después recoger los compuestos apolares (fracción denominada "fracción apolar Ib").

Los soportes apolares adecuados para esta separación incluyen, por ejemplo:

- o los soportes de adsorción de tipo copolímero estireno / divinil benceno, sulfonado o no:
 - FPX68; FPX66 (Dow Chemicals)
 - Sepabeads SP411, SP70, SP700, SP852L, SP850 (Mitsubishi Chemicals);
- o Los soportes microporosos que soportan unos grupos ionizados de tipo sulfona o amina terciaria.
 - FPA51, FPA54, FPC23H, XAD761 (Dow Chemicals),
 - Diaion UBK530, UBK550, WA20, WA30.

Los disolventes polares de lavado que permiten recuperar la fracción polar Ia se pueden seleccionar en particular entre los alcoholes (en particular el etanol, el metanol, el 2-propanol).

Los disolventes apolares de elución que permiten recuperar la fracción apolar Ib según la resina intercambiadora de iones seleccionada se pueden seleccionar en particular entre unas soluciones diluidas de sosa, de potasa, o unas soluciones diluidas de ácido fuerte de ácido clorhídrico, sulfúrico, o baja de ácido cítrico.

Al final de esta etapa a1), la fracción apolar Ib que comprende en particular los compuestos fenólicos apolares tales como los antocianos o antocianidoles y los oligómeros de PAC se separa, mientras que la fracción polar Ia que comprende en particular los azúcares y los ácidos orgánicos se somete a una segunda etapa a2) de purificación.

- en una segunda etapa a2), los ácidos orgánicos presentes en la fracción polar Ia se purifican (y en particular se separan de los azúcares también presentes en la fracción polar Ia) por adsorción sobre una resina intercambiadora de iones (que retiene los ácidos orgánicos, pero no los azúcares). Después del lavado con agua (lo que conduce en particular a una eliminación de la mayoría de los azúcares), una fracción denominada "fracción Ic" enriquecida en ácidos orgánicos de arándano (ácido quínico, ácido cítrico, ácido

málico y ácidos fenólicos en particular) se eluye con la ayuda de un disolvente acuoso ácido.

- en una tercera etapa a3), la fracción I, enriquecida en compuestos polifenólicos apolares (antocianos, antocianidoles, y oligómeros de PAC), por un lado, y en ácidos orgánicos, por otro lado, se obtiene por montaje de las fracciones Ib y Ic.

En la etapa b), la fracción no hidrosoluble (hollejo) se enriquece en polímeros de PAC, para obtener una fracción denominada "fracción II", por un tratamiento que comprende una etapa de extracción de los polímeros de PAC por un disolvente orgánico, preferentemente seguida de etapas de clarificación, destilación y concentración de la disolución enriquecida así obtenida. Diferentes procedimientos de este tipo se describen en la solicitud EP 2 108 268 A1.

Así, el disolvente orgánico utilizado para la extracción puede, en particular, ser seleccionado entre los alcoholes (en particular el etanol), los aldehídos (en particular el acetaldehído) y los ésteres (en particular acetato de etilo). Ventajosamente, el disolvente orgánico utilizado es un alcohol, en particular el etanol.

La cantidad de disolvente orgánico añadida a la fracción hidrosoluble de arándano puede estar, en particular, comprendida entre el 10 y el 15% en volumen, con respecto al volumen de la fracción hidrosoluble de arándano en la que se realiza la extracción.

En particular, la etapa de extracción se puede realizar por extracción hidroalcohólica a contracorriente, las mezclas hidroalcohólicas que comprenden del 35 al 80% de etanol se vierten sucesivamente en partes de hollejo de arándano fresco cada vez menos secas; comprendiendo las fracciones etanólicas, por su parte, cada vez más disolución extraíble de materia seca.

Son ventajosas unas etapas finales de clarificación, destilación y concentración.

Las fracciones I (Ib y Ic enriquecidas en compuestos fenólicos apolares tales como antocianos, antocianidoles, y oligómeros de PAC, y en ácidos orgánicos) y II (enriquecida en polímero de PAC) se reúnen después para formar un extracto enriquecido en estos diferentes compuestos de interés. El montaje se puede realizar en proporciones variables que corresponden a una relación en peso (fracción I/fracción II) comprendida entre 20/80 y 80/20, ventajosamente entre 30/70 y 70/30, entre 35/65 y 65/35, entre 40/60 y 60/40, incluso entre 45/55 y 55/45. Ventajosamente, la relación en peso (fracción I/fracción II) puede ser próxima a 50/50. En efecto, corresponden a un montaje en el que las fracciones I y II obtenidas respectivamente al final de las etapas c) y d) se mezclan simplemente, sin eliminación de una parte de una de las fracciones. Así, el conjunto de los compuestos de interés se valoriza en el extracto, sin pérdida relacionada con la exclusión de una parte de los compuestos de interés.

Sin embargo, se pueden utilizar otras relaciones en peso (fracción I/fracción II) si se desea aumentar o disminuir la proporción en el extracto de algunos compuestos de interés.

El procedimiento según la invención, de preparación del extracto según la invención, comprende además una etapa d) de digestión enzimática por al menos una esterasa. Esta etapa d) tiene como objetivo aumentar la fermentabilidad intestinal del extracto según la invención, hidrolizando, al menos parcialmente, algunos compuestos complejos presentes en el arándano, y no interfiere de manera significativa con las otras etapas del procedimiento de preparación. En consecuencia, se puede realizar en diferentes fases del procedimiento de preparación. En particular, se puede realizar:

- antes de la etapa a), durante la preparación de las fracciones hidrosoluble y no hidrosoluble (por ejemplo entre las etapas i) y ii), en el molido, preferentemente licuado), o bien sobre las fracciones hidrosoluble y no hidrosoluble, preferentemente licuadas,
- entre las etapas a) y b) y la etapa c) de montaje final, en las fracciones I y II, o
- al final del procedimiento, en el extracto montado obtenido al final de la etapa c).

El procedimiento según la invención puede comprender además una etapa adicional de secado del extracto, con el fin de obtener un extracto seco. Tal secado se puede realizar mediante cualquier técnica clásica adecuada, y en particular por atomización, con la ayuda de una torre de secado simple o de múltiples efectos alimentada por unos concentrados acuosos que presentan una materia seca superior al 20% y previamente puesta en temperatura (50°C-80°C). Estos concentrados se pulverizan mediante unos sistemas de conductos y/o de turbinas, y se secan en forma de polvo a partir de gotitas vaporizadas en un flujo de aire seco a temperaturas inferiores a 180°C. Según los casos, las fracciones polifenólicas de los extractos de arándano se pueden secar sin soporte en el caso de los extractos apolares desarrollados, o ventajosamente sobre unos soportes tales como unos carbohidratos (maltodextrina, almidones resistentes, inulina). En el caso de las fracciones particularmente ácidas, las fracciones pueden ser neutralizadas por adición de hidróxido de magnesio antes del secado.

La invención se refiere también a un extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención. Tal extracto comprende, preferentemente:

- 5 - del 5 al 20% en peso, ventajosamente del 10 al 15% en peso, de proantocianidoles (PAC) con respecto al peso total del extracto seco,
- del 2 al 12% en peso, ventajosamente del 3 al 10% en peso, ventajosamente de manera estricta más del 5% y menos del 10% en peso, de ácidos orgánicos con respecto al peso total del extracto seco, incluyendo:
 - 10 o del 1 al 10% en peso, ventajosamente del 1 al 5% en peso, ventajosamente del 1 al 3% en peso de ácido quínico con respecto al peso total del extracto seco,
 - o del 0,5 al 8% en peso, ventajosamente del 1 al 4% en peso, de ácidos fenólicos con respecto al peso total del extracto seco,
- 15 - al menos el 0,5% en peso, ventajosamente al menos el 1% en peso, de antocianos con respecto al peso total del extracto seco,
- 20 - del 1 al 10%, ventajosamente del 1 al 5% en peso, en peso de azúcares con respecto al peso total del extracto seco,
- del 1 al 10% en peso, ventajosamente del 2 al 5% en peso, de flavonoles, con respecto al peso total del extracto seco.

25 El extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención puede también presentarse en diferentes formas, en particular en forma de disolución (particularmente en forma de concentrado líquido), o bien en forma seca. Ventajosamente, el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento de la invención es un extracto seco. Éste puede presentarse en diferentes formas, por ejemplo en forma de polvo, de comprimido, de cápsula dura, de gránulos.

30 La invención se refiere también a una composición alimenticia o nutracéutica que comprende, entre otros, un extracto según la invención o un extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención. Esta composición está destinada a ser ingerida, y comprende por lo tanto sólo unos componentes aceptables para esta aplicación. Puede presentarse en cualquier forma habitualmente utilizada en la alimentación o en la nutracéutica, y en particular en forma de polvo, de cápsula dura, de comprimido, de bebida, o de fórmulas tópicas de tipo geles o jabones.

35 Los extractos según la invención comprenden diferentes compuestos de arándano que tienen *in vivo* unos efectos antibacterianos a nivel del colon.

40 Comprenden también unos ácidos fenólicos en cantidad importante, susceptible de saturar las capacidades del hígado para conjugar los ácidos fenólicos con la glicina, permitiendo esto potencialmente a una parte de estos ácidos fenólicos alcanzar las vías urinarias y ejercer sus efectos bactericidas de manera preventiva o curativa.

45 Los extractos según la invención son particularmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de las infecciones urinarias.

50 La invención se refiere por lo tanto también a una composición farmacéutica, que comprende un extracto según la invención o un extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere además a un extracto según la invención o a un extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención, para su utilización como medicamento.

55 La invención se refiere también a un extracto según la invención o a un extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención, para su utilización en la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias.

60 La invención se refiere también a la utilización de un extracto según la invención o de un extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención, para la preparación de un medicamento, en particular de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de las infecciones urinarias.

65 La invención se refiere además a un método de tratamiento o de prevención de las infecciones urinarias en un sujeto (preferentemente humano, eventualmente animal), que comprende la administración (preferentemente por vía oral) de una cantidad eficaz de un extracto según la invención o de un extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención a dicho sujeto.

Por "tratamiento" se entiende el hecho de disminuir la infección bacteriana a nivel de las vías urinarias. Tal disminución puede ser puesta en evidencia mediante análisis de orina que muestran una disminución del número de bacterias presentes o por una disminución de los síntomas de la infección urinaria (frecuente necesidad de orinar, quemaduras asociadas al hecho de orinar, etc.). Ventajosamente, el tratamiento permite eliminar completamente la infección, pero el término "tratamiento" comprende cualquier disminución significativa de la infección. En el ámbito del tratamiento de las infecciones urinarias, el extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención puede ser asociado a otro tratamiento habitual de las infecciones urinarias, en particular por diferentes antibióticos bien conocidos por el experto en la materia.

Por "prevención" se entiende el hecho de disminuir la probabilidad de aparición de una infección urinaria. Ventajosamente, el extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención permite evitar cualquier infección urinaria durante el tiempo de toma del extracto (probabilidad de que la aparición de infección urinaria sea cero). Sin embargo, el término "prevención" comprende también la posibilidad de disminuir significativamente la frecuencia de aparición de infecciones urinarias en una población de pacientes que ingieran una cantidad eficaz de extracto durante el periodo de extracción del extracto, con respecto a una población de pacientes similares que no toma el extracto (en cuyo caso la probabilidad de infección urinaria durante la toma del extracto se disminuye simplemente de manera significativa). Para tal comparación, las poblaciones comparadas deben ser similares, en particular en lo referente a la proporción de sujetos que tienen habitualmente una frecuencia elevada de aparición de infecciones urinarias.

El extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención son particularmente útiles para la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias por las bacterias uropatógenas: enterobacterias, coliformes, *Escherichia coli* (más particular *E. coli* denominada "manosa resistente" que presenta unas adhesinas fimbrial de tipo I, pero también más generalmente las bacterias gram positivas (en particular *Pseudomonas aeruginosa*), y otras bacterias de tipo *Proteus mirabilis*, las especies del género *Staphylococcus* (en particular *Staphylococcus aureus*), las especies del género *Saprophyticus*, y las especies del género *Klebsiella*. En una forma de realización, el extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias por *Escherichia coli*. En otra forma de realización, el extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias por *Pseudomonas aeruginosa*.

En otra forma de realización más, el extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias por unos hongos, y en particular por las especies del género *Candida*, particularmente *Candida albicans*.

El extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención son particularmente útiles en la prevención de las recidivas urinarias, en pacientes que padecen infecciones urinarias recurrentes más o menos frecuentes.

El extracto según la invención o el extracto susceptible de ser obtenido por el procedimiento según la invención puede ser administrado en particular a pacientes en periodo de curación de una infección urinaria, a fin de disminuir la probabilidad de recidiva. El extracto se administra entonces en cantidades eficaces durante de algunos días (por ejemplo 3, 4, 5, 6 o 7 días) a varias semanas (por ejemplo 2, 3, 4, 5 o 8 semanas).

Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad que permite obtener un efecto de tratamiento o preventivo (tal como se ha definido anteriormente) en el sujeto de interés. Una cantidad eficaz de extracto seco según la invención puede estar comprendida en particular entre 100 y 1.000 mg/kg/día, ventajosamente entre 150 y 450 mg/kg/día.

50 Descripción de las figuras

Figura 1: perfiles cromatográficos en UPLC en fase inversa a 280 nm de las fracciones Ib obtenidas con o sin tratamiento por enzima previo (Pectinex Ultra SP-L; Cellulase 13L; Tannase 795P; Endozym B-split) al 0,05% de la materia seca utilizada en el molido de arándano.

Figura 2: Perfiles cromatográficos en UPLC en fase inversa a 280 nm de las fracciones II obtenidas con o sin tratamiento por enzima previo (Pectinex Ultra SP-L; Cellulase 13L; Tannase 795P; B-split) al 0,05% de la materia seca utilizada en el molido de arándano.

Figura 3. Efectos bactericidas de diferentes extractos sobre *Escherichia coli* (ATCC 8739): crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 8739) en un medio de cultivo en ausencia de extracto (control sin extracto), en presencia de la fracción Ib a 5 g/l, de la fracción (Ic+II) a 5 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 5g/l total (es decir 2,5 g/l de fracción Ib y 2,5 g/l de fracción (Ic+II), extracto combinado), para un recuento sin filtración (A) o después de la filtración de los agregados (B). Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II) por otro lado.

Figura 4. Efectos bactericidas de diferentes extractos sobre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027): (A) Crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) en un medio de cultivo en ausencia de extracto (control sin extracto), en presencia de la fracción Ib a 0,5 g/l, de la fracción (Ic+II) a 0,5 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 0,5 g/l total (es decir 0,25 g/l de fracción Ib y 0,25 g/l de fracción (Ic+II), extracto combinado), para un recuento sin filtración. Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II) por otro lado. (B) Crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) en un medio de cultivo en ausencia de extracto (Control sin extracto), en presencia de la fracción Ib a 0,1 g/l, de la fracción (Ic+II) a 0,1 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 0,1 g/l total (es decir 0,05 g/l de fracción Ib y 0,05 g/l de fracción (Ic+II), Extracto combinado), para un recuento después de la filtración de los agregados. Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II) por otro lado.

Figura 5. Efectos bactericidas de diferentes extractos sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538): crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) en un medio de cultivo en ausencia de extracto (Control sin extracto), en presencia de la fracción Ib a 0,1 g/l, de la fracción (Ic+II) a 0,1 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 0,1 g/l total (es decir 0,05 g/l de fracción Ib y 0,05 g/l de fracción (Ic+II), Extracto combinado), para un recuento sin filtración (A) o después de la filtración de los agregados (B). Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II).

Figura 6. Efectos fungicidas de diferentes extractos sobre *Candida albicans* (ATCC 10231): crecimiento de los hongos *Candida albicans* (ATCC 10231) en un medio de cultivo en ausencia de extracto (Control sin extracto), en presencia de la fracción Ib a 0,5 g/l, de la fracción (Ic+II) a 0,5 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 0,5 g/l total (es decir 0,25 g/l de fracción Ib y 0,25 g/l de fracción (Ic+II), Extracto combinado), para un recuento sin filtración (A) o después de la filtración de los agregados (B). Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II) por otro lado.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de un extracto desesterificado de arándano según la invención,

Se han molido 5 kg de arándano IQF con la ayuda de un molino de martillo y se han diluido por 2 los 400 g de materia seca de molido así obtenido. La masa de molido se dividió por dos y se trató directamente o bien se sometió a un tratamiento enzimático en agua que procede de una mezcla de enzimas que comprende:

- 0,05 g de Pectinex Ultra-SP L,
- 0,05 g de tanasa 795P,
- 0,05 g de celulasa 13L, y
- 0,05 g de Endozym B-Split.

La mezcla se llevó a 40°C durante 4h, bajo agitación.

Los molidos se prensaron después y los 2 jugos obtenidos se clarificaron por centrifugación (3.000 rpm, 10 min.) y los sobrenadantes se almacenaron en frío. Los residuos de centrifugación se añadieron a los dos hollejos de arándano obtenidos paralelamente.

Los hollejos se extrajeron después con una mezcla hidroalcohólica al 75% de etanol v/v para una relación de 3 por 1, la disolución hidroetanólica así obtenida se filtró sobre un filtro PTFE de 0,2 µm de porosidad, después se concentró bajo vacío a temperatura moderada (50°C) a fin de obtener una suspensión concentrada que se secó por liofilización.

Las fracciones de jugo obtenidas se pasaron en una columna de adsorción llena con 200 ml de resina Sepabeads SP411 (BV), a la velocidad de 600 ml/h; el resto del jugo se lava después con 800 ml de agua y la columna se eluye finalmente con 400 ml de etanol. El eluido obtenido se concentra finalmente por evaporación a vacío (50°C) y se recoge en agua y se liofiliza para formar las fracciones la que han sufrido una hidrólisis enzimática o no.

Los extractos acuosos parcialmente decolorados (fracción Ib) se pasaron después en una resina intercambiadora de aniones llena de 200 ml de resina FPA51 previamente puesta en su forma de cloruro con 400 ml de ácido clorhídrico al 0,1% y aclarada con agua. Las fracciones Ib se pasaron en la resina a 600 ml/h y se lavaron con 400 ml de agua. Los ácidos orgánicos retenidos se eluyeron con 400 ml de ácido clorhídrico al 0,05%, y después se concentraron a

vacío formando la fracción Ic.

Ejemplo 2. Caracterización del extracto según la invención

5 Se ha caracterizado el extracto producto en el ejemplo 1.

Los perfiles cromatográficos en UPLC en fase inversa a 280 nm de las fracciones Ib y II obtenidas con o sin tratamiento por enzima previa (Pectinex Ultra SP-L; Cellualse 13L; Tannase 795P; B-split) al 0,05% de la materia seca utilizada en el molido de arándano se presentan respectivamente en las figuras 1 y 2.

10 Estas figuras muestran claramente el efecto de la desesterificación (tratamiento por al menos una esterasa) sobre la modificación de composición del extracto.

15 Los análisis de las diferentes fracciones de interés obtenidas se describen en la tabla 2 siguiente. Las fracciones fenólicas Ib y II pueden ser ventajosamente complementadas por los ácidos orgánicos del eluato Ic.

Tabla 2. Caracterización de las fracciones desesterificadas obtenidas con utilizaciones de esterases durante la extracción

en g/100g	Fracción Ib	Fracción Ic	Fracción II
Ácidos orgánicos			
Ác. málico	0,11%	11,88%	1,93%
Ác. quínico	0,25%	33,26%	3,17%
Ác. cítrico	0,18%	14,21%	3,12%
Ácidos fenólicos			
Ác. gálicos	0,07%	0,59%	0,33%
Ác. protocatéquico	0,06%	0,43%	0,05%
Ác. benzoico	0,37%	1,48%	0,48%
Ácido cinámico			
Ác. p-cumárico	0,31%	2,48%	1,40%
Ác. cafeico	0,07%	0,49%	0,06%
Ácido ferúlico	0,05%	0,20%	0,07%
Antocianos			
Eq cianidol	1,03%	nd	0,25%
Flavonoles			
Eq quercetina	3,24%	nd	1,70%
Proantocianidoles			
DMAC	16,10%	nd	5,70%
Farmacopea europea	88,6%	nd	35,50%

20 Entre las fracciones obtenidas, las fracciones Ib y II se pueden montar con el concentrado líquido Ic que contiene lo esencial de los ácidos orgánicos del arándano, permitiendo así formular unos extractos secos específicos que contienen al mismo tiempo unos polifenoles y unos ácidos polares.

25 Ejemplo 3. Formulaciones que comprenden el extracto según la invención

Se pueden considerar diferentes tipos de comprimidos que contienen los extractos desarrollados, siendo el objetivo general de este proceso al mismo tiempo aumentar el potencial bactericida y bacteriostático de los diferentes componentes activos del arándano directamente en forma de ácidos fenólicos y de proantocianidoles aglomerantes a nivel del colon, o en forma de ácidos fenólicos una vez absorbidos en la circulación general y excretados en la orina.

30 Es importante recordar que, a nivel del colon, la conservación del poder curtiente de los proantocianidoles de tipo B y A, implica que las funciones ortodifenólicas que comprenden no se hayan oxidado previamente y/o movilizadas por las proteínas y aminoácidos del bolo alimenticio.

35 Típicamente, para limitar estas interacciones durante el tránsito, se pueden considerar varias soluciones:

- limitar la aportación proteica, en el momento de la cura y durante la toma de los activos de arándano, podrá así ser favorable para la eficacia de los extractos de arándano desarrollados.
- favorecer unas formas galénicas de liberación enteral prolongada.
- complementar la fórmula del complemento alimenticio por un reductor capaz de ralentizar la oxidación de los polifenoles, típicamente el ácido ascórbico puede desempeñar este papel. Además, su poder reductor puede

40

contribuir directa o indirectamente a la reducción colónica del ácido quínico en ácido benzoico.

Se pueden desarrollar las composiciones de comprimidos clásicas, favoreciendo una liberación enteral prolongada a fin de limitar las interacciones. En consecuencia, las composiciones galénicas retenidas serán importantes para dirigir la flora uropatológica sensible al efecto de los compuestos fenólicos de arándano, al mismo tiempo:

- los ácidos fenólicos directamente presentes en el extracto empleado,
- el ácido quínico precursor de ácido benzoico producido por reducción por la flora intestinal,
- los flavonoles y antocianos, así como los flavonoles monómeros y proantocianidoles oligómeros que comprenden unas uniones de tipo B y de tipo A fermentables por la flora intestinal, precursores de ácidos fenólicos.
- el efecto bacterioestático, aglomerante de los taninos proantocianidoles de arándano poco fermentables polímeros, es decir los proantocianidoles de más alto peso molecular que comprenden preferiblemente varios enlaces de tipo A.

El comprimido se traga, se disuelve y debe ser, por lo tanto, absorbido en todo el tracto gastrointestinal. Se pueden utilizar una gran variedad de soportes, incluyendo la lactosa, el fosfato de calcio, el almidón, la celulosa microcristalina, unas celulosas modificadas como, por ejemplo, la hidroxipropilmetilcelulosa y la hidroxietilcelulosa. También se pueden considerar unas fórmulas con unos agentes de recubrimientos tales como el azúcar, el barniz o la cera para ocultar el sabor, a fin de aumentar la resistencia del comprimido durante el paso del estómago. Estos revestimientos hacen al comprimido resistente a los ácidos del estómago y tales que se desintegran sólo en el duodeno, el yeyuno y en el colon tras la acción de las enzimas y/o del pH alcalino.

Los comprimidos diana que utilizan los extractos de arándano desarrollan una preparación de comprimido que contienen generalmente:

- del 5 al 25% del extracto de arándano (sustancia activa),
- del 0 al 10% de agente reductor, típicamente ácido ascórbico,
- del 70 al 85% de cargas matriciales que permiten la cohesión y la compresión, típicamente unos polímeros de base celulósica,
- del 0 al 15% de los compuestos que aseguran la desintegración fácil, la desintegración y la disolución del comprimido a partir del estómago o del intestino,
- del 0 al 10% de agentes lubricantes, de agentes de deslizamiento, unas ceras y agentes de recubrimiento, y de aglutinantes complementarios.
- el tiempo de desintegración puede ser modificado para obtener un efecto rápido o para la liberación prolongada.

Como se describe a continuación, las diferentes fracciones, en sinergia con la farmacocinética de liberación enteral de los comprimidos, permiten controlar la utilización del conjunto de los activos del arándano.

Tabla 3: Ejemplos de composición de comprimidos de 500 mg de liberación enteral prolongada especialmente formuladas en el ámbito del tratamiento curativo, de un tratamiento sinérgico completo, de un tratamiento preventivo, y que permite una transferencia metabólica permanente de los activos de arándano.

En el ámbito de una cura de 15 días (2 x 500 mg / día)		Tratamiento curativo		Tratamiento sinérgico completo		Tratamiento preventivo	
Velocidad de disolución		Disolución rápida		Disolución media		Disolución lenta	
Mezcla	Tipo	Precursores metabolizables		Precursores metabolizables y taninos		Esencialmente taninos Poco metabolizado	
		mg	%	mg	%	mg	%
Extracto de arándano	Fracción I	100	20%	60	12%	20	4%

En el ámbito de una cura de 15 días (2 x 500 mg / día)		Tratamiento curativo		Tratamiento sinérgico completo		Tratamiento preventivo	
Velocidad de disolución		Disolución rápida		Disolución media		Disolución lenta	
Mezcla	Tipo	Precusores metabolizables		Precusores metabolizables y taninos		Esencialmente taninos Poco metabolizado	
		mg	%	mg	%	mg	%
Extracto de arándano	Fracción II	20	4%	60	12%	100	20%
Ácido ascórbico		40	8%	40	8%	40	8%
Hidroxipropil-metilcelulosa	Metolosas 90SH 4000SR	50	10%	70	14%	90	18%
Diluyente	Microcel	2175	44%	217,5	44%	217,5	44%
	Lactosa	55	11%	35	7%	15	3%
Talco		10	2%	10	2%	10	2%
Sílice coloidal	Aerosil	2,5	0,50%	2,5	0,50%	2,5	0,50%
Estearato de Mg		5	1%	5	1%	5	1%
Total		500	100%	500	100%	500	100%

Como se describe en la tabla 3 anterior, las vías de extracción y las diferentes fuentes de polifenoles de arándano (fruto, jugo, hollejo) expuestas anteriormente permiten diferenciar varias composiciones que comprenden las actividades bacterioestáticas y bactericidas de interés en el ámbito:

- 5
- de un tratamiento de tipo cura rápida, más particularmente bactericida,
 - de un tratamiento sinérgico bacterioestático y bactericida,
- 10
- de un tratamiento "antirrecidiva" o denominado de "prevención" esencialmente bacterioestático.

Es conocido que el riesgo de aparición de infecciones urinarias es favorecido por un bajo consumo de agua. Favorecer un consumo de agua más elevado en el ámbito de un tratamiento (al menos 2l por día) con los extractos de la invención, permite formular o bien unas soluciones bucodispersables o unas bebidas diluidas particularmente, o bien adecuadas para el tratamiento considerado. Los extractos simples y/o sus mezclas sinérgicas descritos anteriormente se mezclan, en primer lugar, con unas fibras, es decir unos coloides resistentes a la hidrólisis digestiva superior (pH ácido estomacal, enzimas del intestino delgado), que permite favorecer la liberación de los taninos de arándano a nivel del colon.

20 Tabla 4: ejemplo de composición de bebida diluida y su forma de reconstitución denominada "bebida instantánea"

Composición de bebida instantánea	bebida que se va a reconstituir	
	% en g/100g	diluida en g/l
Extracto de arándano	1,6%	0,25
Almidón resistente pregelificado	15,6%	2,5
Maltodextrina	6,2%	1
Goma xantana	0,9%	0,15
Ácido cítrico	12,5%	2
Sacarosa	62,3%	10
acesulfame K; sacarosa	0,05%	0,01
Cloruro de sodio	0,6%	0,1
Total	100,0%	16,05

Ejemplo 4. Efectos antimicrobianos del extracto según la invención

Se han ensayado los efectos antimicrobianos del extracto según la invención, y se han comparado con los de extractos más simples, que comprenden:

- fracción Ib tal como se obtiene en el ejemplo 1 y caracterizada en el ejemplo 2: fracción que comprende principalmente unos proantocianidoles (PAC) de un grado de polimerización medio de aproximadamente 4, así como unos antocianos. Esta fracción contiene sólo muy pocos ácidos orgánicos (véase la tabla 2 anterior). El efecto antibacteriano de esta fracción puede estar relacionado con las PAC y/o con los antocianos.
- fracciones Ic y II (Ic+II) tales como se obtienen en el ejemplo 1 y caracterizadas en el ejemplo 2: mezcla que comprende una pequeña proporción de PAC de un grado de polimerización medio de aproximadamente 8, así como una fuerte proporción de ácidos orgánicos (véase la tabla 2 anterior). El efecto antibacteriano de esta mezcla está principalmente relacionado con los ácidos orgánicos presentes (y en particular con los ácidos fenólicos más apolares), y eventualmente de manera parcial con las PAC.

En particular, la capacidad de las fracciones Ib, (Ic+II), de una mezcla de 50/50 en peso de fracciones Ib y (Ic+II), para inhibir la proliferación de diferentes microorganismos, se ha medido a fin de poner en evidencia una eventual sinergia entre los dos tipos de extractos, siendo uno más bien dirigido hacia los ácidos orgánicos, el otro más bien hacia las PAC y los antocianos.

Se han seleccionado cinco microorganismos:

- Tres especies de bacterias conocidas por estar implicadas en las infecciones del tracto urinario:
 - *Escherichia coli* (ATCC 8739): esta bacteria gram-negativa responsable de una proporción importante de las infecciones del tracto urinario (Orenstein *et al.*, 1999, Shigemura *et al.*, 2005) y es por lo tanto esencial que el extracto según la invención tenga una acción inhibitoria sobre esta bacteria.
 - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027): esta bacteria gram-negativa es responsable de una proporción más o menos importante (según el origen de la infección y el origen geográfico del paciente) de las infecciones del tracto urinario (Orenstein *et al.*, 1999, Shigemura *et al.*, 2005), en particular unas infecciones complicadas. En efecto, conduce frecuentemente a unas infecciones persistentes, crónicas, resistentes a los antibióticos y finalmente recidivantes. Por lo tanto, sería también útil que el extracto según la invención tenga una acción inhibitoria sobre esta bacteria.
 - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538): esta bacteria gram-positiva se encuentra también en ciertas infecciones del tracto urinario (Shigemura *et al.*, 2005). Además, ciertas cepas son resistentes a los antibióticos clásicos, y sería por lo tanto también útil que el extracto según la invención tenga una acción inhibitoria sobre esta bacteria.
- Dos cepas de hongos:
 - *Candida albicans* (ATCC 10231): este hongo es responsable de un cierto número de infecciones del tracto urinario, en particular en los pacientes de riesgo, debido a su avanzada edad, a enfermedades crónicas como la diabetes, o a tratamientos prolongados por unos tratamientos inmunosupresores o anticancerígenos (Krcmery *et al.*, 1999).
 - *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404): este hongo no es particularmente conocido por estar asociado a unas infecciones del tracto urinario, pero constituye un modelo de estudio para cuantificar unos efectos sobre los mohos.

Las cepas seleccionadas corresponden además a unas cepas recomendadas en los métodos reglamentarios actuales para los ensayos de la eficacia de conservación, y de contaminación de los alimentos o de producto de higiene.

Los microorganismos se han inoculado en un medio de cultivo adecuado y cultivados en placas de 96 pocillos. Se ha efectuado un recuento de los microorganismos en los días 1, 3, 7, 14 y 21 con un ensayo de trifeniltetrazolio (TTC) para las tres cepas bacterianas y para *Candida albicans*. Este ensayo se basa en la transformación del TCC blanco en trifenilformazan (TPF) rojo por las células vivas en multiplicación. La detección del TPF permite entonces estimar el número de microorganismos presentes en el medio. Para *Aspergillus brasiliensis*, se efectúa un recuento sobre caja convencional.

El recuento de los microorganismos se realiza o bien directamente sobre el cultivo, o bien después de la filtración del cultivo para eliminar los agregados. En efecto, las PAC son conocidas por agregar las bacterias formando unas

acumulaciones en cultivo, limitando así la formación de biopelículas o la interacción de las bacterias con las mucosas infectadas. La identificación de la presencia de tales agregados es por lo tanto importante, y los resultados obtenidos después de la filtración son los más representativos de los efectos globales de los extractos ensayados.

5 Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 3 a 6, para cuatro microorganismos ensayados.

Escherichia coli

10 Las figuras 3A y 3B muestran respectivamente el crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo en ausencia de extracto, en presencia de la fracción Ib a 5 g/l, de la fracción (Ic+II) a 5 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 5g/l total (es decir 2,5 g/l de fracción Ib y 2,5 g/l de fracción (Ic+II)). Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II) por otro lado. Los resultados se presentan para una medición sin filtración (figura 3A) o con filtración de los agregados (figura 3B).

15 En ausencia de filtración, la fracción Ib es más eficaz que la fracción (Ic+II) para inhibir el crecimiento de *E. Coli in vitro*. El extracto combinado (mezcla de las fracciones Ib y (Ic+II)) es casi tan eficaz como la fracción Ib sola, a pesar de que contiene sólo la mitad de la concentración en fracción Ib con respecto a la fracción Ib sola. Sin embargo, los resultados obtenidos con el extracto combinado son mucho mejores que la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib y (Ic+II) separadamente. Estos resultados sugieren un efecto de sinergia.

20 Cuando se realiza el recuento después de la filtración de los agregados, la fracción Ib es otra vez más eficaz que la fracción (Ic+II) para inhibir el crecimiento de *E. Coli in vitro*. El extracto combinado (mezcla de las fracciones Ib y (Ic+II)) es tan eficaz como la fracción Ib sola, a pesar de que contiene sólo la mitad de la concentración en fracción Ib con respecto a la fracción Ib sola. Además, los resultados obtenidos con el extracto combinado son mucho mejores que la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib y (Ic+II) separadamente. Estos resultados sugieren otra vez un efecto de sinergia entre las dos fracciones sometidas a ensayo (Ib/Ic+II).

Pseudomonas aeruginosa

30 La figura 4A muestra el crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo en ausencia de extracto, en presencia de la fracción Ib a 0,5 g/l, de la fracción (Ic+II) a 0,5 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 0,5g/l total (es decir 0,25 g/l de fracción Ib y 0,25 g/l de fracción (Ic+II)), siendo el recuento realizado sin filtración de los agregados susceptibles de estar presentes en el cultivo.

35 La fracción Ib es ligeramente más eficaz que la fracción (Ic+II) para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. El extracto combinado (mezcla de las fracciones Ib y (Ic+II)) es tan eficaz como la fracción Ib sola, a pesar de que contiene sólo la mitad de la concentración en fracción Ib con respecto a la fracción Ib sola. Además, los resultados obtenidos con el extracto combinado son mejores que la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib y (Ic+II) separadamente. Estos resultados sugieren un efecto de sinergia.

40 La figura 4B representa el crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo en ausencia de extracto, en presencia de la fracción Ib a 0,1 g/l, de la fracción (Ic+II) a 0,1 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 0,1g/l total (es decir 0,05 g/l de fracción Ib y 0,05 g/l de fracción (Ic+II)), siendo el recuento realizado después de la filtración de los agregados susceptibles de estar presentes en el cultivo.

45 La fracción (Ic+II) es, esta vez, más eficaz que la fracción Ib para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa in vitro*. El extracto combinado (mezcla de las fracciones Ib y (Ic+II)) es más eficaz que cada una de las fracciones Ib o (Ic+II) sola, a pesar de que contiene sólo la mitad de la concentración en fracción Ib con respecto a la fracción Ib sola, ya que actúa más rápidamente que cada una de las fracciones Ib o (Ic+II) sola. Estos resultados muestran claramente la existencia de un efecto de sinergia entre las dos fracciones ensayadas (Ib/Ic+II).

Staphylococcus aureus

55 Las figuras 5A y 5B representan respectivamente el crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo en ausencia de extracto, en presencia de la fracción Ib a 5 g/l, de la fracción (Ic+II) a 5 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 5g/l total (es decir 2,5 g/l de fracción Ib y 2,5 g/l de fracción (Ic+II)). Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II) por otro lado. Los resultados se presentan para una medición sin filtración (figura 5A) o con filtración de los agregados (figura 5B).

60 En los dos casos, cada uno de los extractos separadamente y el extracto combinado son extremadamente eficaces para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus in vitro*, hasta tal punto que las condiciones ensayadas no permiten poner en evidencia una sinergia entre los dos extractos, siendo cada uno de los extractos ya eficaz al máximo. Sin embargo, no se puede excluir la presencia de una sinergia, que podrá quizás ser demostrada utilizando unas concentraciones más bajas de extractos. Los efectos de las combinaciones de las fracciones fenólicas son

claramente dependientes de la cepa y la *Staphylococcus aureus*, cepa Gram positiva, comprende una pared particularmente sensible a los efectos de las fracciones ensayadas en el presente contexto.

Candida albicans

5 Las figuras 6A y 6B representan respectivamente el crecimiento de los hongos en un medio de cultivo en ausencia de extracto, en presencia de la fracción Ib a 0,5 g/l, de la fracción (Ic+II) a 0,5 g/l, o de la mezcla de la fracción Ib y de la fracción (Ic+II) a 0,5g/l total (es decir 0,25 g/l de fracción Ib y 0,25 g/l de fracción (Ic+II)). Se indican también los resultados que corresponden a la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib, por un lado, y (Ic+II) por otro lado. Los resultados se presentan para una medición sin filtración (figura 6A) o con filtración de los agregados (figura 6B).

15 En ausencia de filtración, la fracción Ib es claramente más eficaz que la fracción (Ic+II) para inhibir el crecimiento de *Candida albicans in vitro*. El extracto combinado (mezcla de las fracciones Ib y (Ic+II)) posee una actividad inhibidora intermedia, no obstante mejor que la media de los resultados obtenidos con cada una de las fracciones Ib y (Ic+II) separadamente.

20 Cuando se realiza el recuento después de la filtración de los agregados, la fracción Ib es otra vez más eficaz que la fracción (Ic+II) para inhibir el crecimiento de *Candida albicans in vitro*. El extracto combinado (mezcla de las fracciones Ib y (Ic+II)) es más eficaz que cada una de las fracciones Ib o (Ic+II) sola, a pesar de que contiene sólo la mitad de la concentración en fracción Ib con respecto a la fracción Ib sola, ya que actúa más rápidamente que cada una de las fracciones Ib o (Ic+II) sola. Estos resultados muestran claramente la existencia de un efecto de sinergia entre las dos fracciones sometidas a ensayo (Ib/Ic+II).

Aspergillus brasiliensis

No se ha observado ninguna inhibición significativa para ninguno de los extractos sometidos a ensayo.

Conclusión

30 Los resultados presentados anteriormente muestran claramente que el extracto según la invención, que combina las fracciones Ib, Ic y II, posee una actividad antimicrobiana sobre tres bacterias y un hongo conocidos por ser responsables de infecciones del tracto urinario.

35 Además, al menos en ciertas condiciones, se ha podido poner en evidencia un efecto de sinergia entre la fracción Ib rica en PAC de un grado de polimerización medio de aproximadamente 4 y que comprende también unos antocianos, por un lado, y la fracción Ic+Ii rica en ácidos orgánicos y que comprende también una proporción de PAC de un grado de polimerización medio de aproximadamente 8, por otro lado, demostrando así todo el interés del extracto según la invención, que combina los diferentes productos activos del arándano en forma concentrada, para mejorar el tratamiento o la prevención de las infecciones del tracto urinario.

Conviene señalar que la sinergia entre los diferentes componentes activos del extracto según la invención podría ser aún más pronunciada *in vivo*.

45 En efecto, *in vivo*, el efecto de los ácidos orgánicos, y en particular de los ácidos fenólicos más apolares como el ácido benzoico, está potencialmente limitado en la orina debido a su conjugación con glicina para formar ácido hipúrico cuando están en la circulación entero-hepática, antes de su excreción en la orina.

50 Ahora bien, el extracto según la invención comprende, además de los ácidos fenólicos, diferentes precursores de estos ácidos, y en particular del ácido benzoico. Es el caso del ácido quínico, que puede ser transformado en ácido benzoico por aromatización reductora. Es también el caso de los oligómeros de PAC, que no pasan la barrera intestinal, pero son fermentados por la flora intestinal y escindidos para formar unos ácidos fenólicos de cadenas cortas. Así, además de sus efectos de agregación de los microorganismos en el tracto digestivo, las PAC son también útiles como precursores de ácidos fenólicos. Además, el grado de polimerización de las PAC tiene una influencia importante sobre su fermentabilidad por la flora intestinal, como se ha podido demostrar para las PAC de tipo B de la manzana (Bazzocco *et al.*, 2008). Las PAC oligoméricas son más propensas a producir unos ácidos fenólicos, mientras que los polímeros superiores, menos fermentables, pueden inhibir la flora por agregación. Este efecto es también responsable de la reducción de las poblaciones de floras en los experimentos después de la filtración en comparación con la reducción sin filtración. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* sin filtración a 0,5 g/l, el efecto de la fracción (Ic+II) sola es más baja que la fracción Ib sola (figura 4A). En comparación, el efecto para las mismas fracciones a 0,1 g/l después de la filtración se invierte. Después de la filtración, la fracción (Ic+II) sola es más eficaz, a pesar de que comprende menos PAC que la fracción Ib, pero más polimerizados, formando así eficazmente unos agregados. Estos efectos son particularmente adecuados para la formulación de curas, de tratamientos de ataques o de tratamiento de fondo antirecidivo, modificando las proporciones de las diferentes fracciones tales como se describen en la tabla 3.

Finalmente, es también el caso de los antocianos y/o antocianidoles, que son como, los oligómeros de PAC, fermentados por la flora intestinal y escindidos para formar unos ácidos fenólicos de cadenas cortas en el colon, incluyendo los ácidos benzoicos.

5 La combinación en el extracto según la invención de la presencia de ácidos fenólicos y de diversos precursores que conducen más o menos rápidamente a nuevos ácidos fenólicos, tiene como ventaja conducir a una mayor concentración de ácidos fenólicos, sostenida en el tiempo, que permite así potencialmente saturar el sistema de conjugación de los ácidos fenólicos, con la glicina para formar el ácido hipúrico, unos ácidos fenólicos no conjugados, más activos, que pueden así alcanzar la orina, lo que tiene poca posibilidad de producirse cuando están presentes solamente unos ácidos fenólicos.

Referencias bibliográficas

15 Appeldoorn, M. M., Vincken, J. P., Gruppen, H., y Hollman, P. C. (2009) Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats, *J Nutr* 139, 1469-1473;

Blumenthal M, Hall T, Goldberg A, Kunz T, Kinda K, editors. 2003. *The ABC Clinical Guide to Herbs*. Austin (TX): American Botanical Council.

20 Cong, D., Fong, A. K., Lee, R., y Pang, K. S. (2001) Absorption of benzoic acid in segmental regions of the vascularly perfused rat small intestine preparation, *Drug Metab Dispos* 29, 1539-1547;

EP 0 752 871 B1;

25 EP 1 014 969 B1;

EP 2 033 641 A1;

30 EP 2 108 268 A1;

Bazzocco, S.; Mattila, I., Guyot, S.; Renard, C.M.G.C.; Aura, A-M. Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *European Journal of Nutrition* vol. 47 issue 8 diciembre de 2008. p. 442 - 452.

35 Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., y Prior, R. L. (2002) Fracciónation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method, *J Agric Food Chem* 50, 4852-4860;

40 Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg Med Chem*. 1 de sep. de 2005;13(17):5195-205.

Krcmery S, Dubrava M, Krcmery V Jr. Fungal urinary tract infections in patients at risk. *Int J Antimicrob Agents*. mayo de 1999;11(3-4):289-91.

45 Orenstein R, Wong ES. Urinary tract infections in adults. *Am Fam Physician*. 1 de marzo de 1999;59(5):1225-34, 1237.

Ou, K., Percival, S. S., Zou, T., Khoo, C., y Gu, L. (2012) Transport of cranberry A-type procyanidin dimers, trimers, and tetramers across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells, *J Agric Food Chem* 60, 1390-1396;

50 Pratt, D.E., Powers, J.J. y Somaatmadja, D. (1960) Anthocyanins. I. The influence of strawberry and grape anthocyanins on the growth of certain bacteria. *Food Research* 25, 26±32.

55 Sanchez-Patan, F., Bartolome, B., Martin-Alvarez, P. J., Anderson, M., Howell, A., y Monagas, M. (2012) Comprehensive assessment of the quality of commercial cranberry products. Phenolic characterization and *in vitro* bioactivity, *J Agric Food Chem* 60, 3396-3408,

60 Shigemura K, Tanaka K, Okada H, Nakano Y, Kinoshita S, Gotoh A, Arakawa S, Fujisawa M. Pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility of urinary tract infection cases during a 20-year period (1983-2002) at a single institution in Japan. *Jpn J Infect Dis*. octubre de 2005;58(5):303-8.

US 2010/028468;

WO 2010/121203;

65 WO 96/30033

REIVINDICACIONES

1. Extracto de arándano, ventajosamente desesterificado, que comprende:

- 5 • 5 a 20% en peso, ventajosamente 10 a 15% en peso, de proantocianidoles (PAC) con respecto al peso total del extracto seco (medido mediante el método de BL-DMAC),
- 10 • 2 a 12% en peso, ventajosamente 3 a 10% en peso, ventajosamente de manera estricta más de 5% y menos de 10% en peso de ácidos orgánicos con respecto al peso total del extracto seco, incluyendo:
 - 15 ○ 1 a 10% en peso, ventajosamente 1 a 5% en peso, ventajosamente 1 a 3% en peso de ácido quínico con respecto al peso total del extracto seco,
 - 0,5 a 8% en peso, ventajosamente 1 a 4% en peso, de ácidos fenólicos con respecto al peso total del extracto seco,
- 20 • por lo menos 0,5% en peso, ventajosamente por lo menos 1% en peso, de antocianos y/o de anticianidoles con respecto al peso total del extracto seco,
- 1 a 10% en peso de azúcares con respecto al peso total del extracto seco,
- 1 a 10% en peso, ventajosamente 2 a 5% en peso, de flavonoles, en forma glicosilada /o aglicona.

2. Extracto según la reivindicación 1, caracterizado por que los polímeros de PAC que presentan un grado de polimerización superior o igual a 4, representan por lo menos 30% en peso con respecto al peso de todas los PAC presentes en el extracto.

3. Procedimiento de preparación de un extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende las etapas siguientes:

- 30 a) enriquecer una fracción hidrosoluble de arándano en compuestos polifenólicos apolares por un lado, y en ácidos orgánicos, por otro lado, para obtener una fracción I,
- 35 b) enriquecer una fracción no-hidrosoluble de arándano en polímeros de PAC para obtener una fracción II,
- c) montar las fracciones I y II obtenidas en las etapas a) y b) respectivamente, en las proporciones que corresponden a una razón en peso (fracción I/fracción II) comprendida entre 30/70 y 70/30, y
- 40 d) digerir enzimáticamente mediante por lo menos una esterasa.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que:

- 45 • la fracción hidrosoluble utilizada en la etapa a) es un zumo de arándano, eventualmente concentrado, y la fracción no hidrosoluble utilizada en la etapa b) es un hollejo de arándano, o
- la fracción hidrosoluble utilizada en la etapa a) y la fracción no hidrosoluble utilizada en la etapa b) se han obtenido a partir de bayas de arándano enteras, por:
 - 50 i) molienda de bayas de arándano enteras, y
 - ii) decantación y separación de las fracciones hidrosoluble y no hidrosoluble.

5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, caracterizado por que la fracción I se obtiene en la etapa a) mediante las etapas siguientes:

- 55 a1) separar entre los compuestos apolares y los compuestos polares por:
 - 60 • adsorción de la fracción hidrosoluble sobre un soporte apolar,
 - lavado con un disolvente polar y recogida de la fracción polar la, y
 - elución y recogida de la fracción apolar Ib;
- a2) separar entre los ácidos orgánicos y los azúcares presentes en la fracción polar la por:
 - 65 • adsorción de la fracción la sobre una resina intercambiadora de iones,

- lavado con un disolvente acuoso,
 - elución con un disolvente ácido y recogida de la fracción Ic que comprende los ácidos orgánicos;
- 5 a3) montar las fracciones Ib y Ic para formar la fracción I.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, caracterizado por que la fracción II se obtiene en la etapa b) mediante un tratamiento que comprende una etapa de extracción de los polímeros de PAC de la fracción no hidrosoluble por un disolvente orgánico, preferentemente seguida de etapas de clarificación, destilación y concentración de la disolución enriquecida así obtenida.
- 10
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, caracterizado por que el montaje de la fracción I obtenida en la etapa a) y de la fracción II obtenida en la etapa b) se realiza por mezcla simple de las fracciones I y II, sin eliminación de una parte de una de las fracciones.
- 15
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, caracterizado por que la etapa d) de digestión enzimática mediante por lo menos una esterasa se realiza:
- antes de la etapa a), durante la preparación de las fracciones hidrosoluble y no hidrosoluble sobre el molido, preferentemente licuado, o bien sobre la fracción hidrosoluble y la fracción no hidrosoluble, preferentemente licuadas,
 - entre las etapas a) y b) y la etapa c) de montaje final, sobre las fracciones I y II, o
 - al final del procedimiento, sobre el extracto montado obtenido al término de la etapa c).
- 20
- 25
9. Extracto susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-8.
- 30 10. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 9, que es un extracto seco, y que se presenta ventajosamente en forma de polvo, de comprimido, de cápsula, de gránulos, o de concentrado líquido.
- 35 11. Composición alimenticia o nutracéutica, que comprende un extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 9-10.
12. Composición farmacéutica, que comprende un extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 9-10.
13. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 9-10, para su utilización como medicamento.
- 40 14. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 9-10, para su utilización en la prevención o el tratamiento de las infecciones urinarias, en particular por las bacterias uropatógenas, las bacterias gram positivas, y otras bacterias seleccionadas de entre *Proteus mirabilis*, las especies del género *Staphylococcus*, las especies del género *Saprophyticus*, y las especies del género *Klebsiella*.
- 45 15. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 9-10, para su utilización en la prevención de las recidivas de infecciones urinarias.

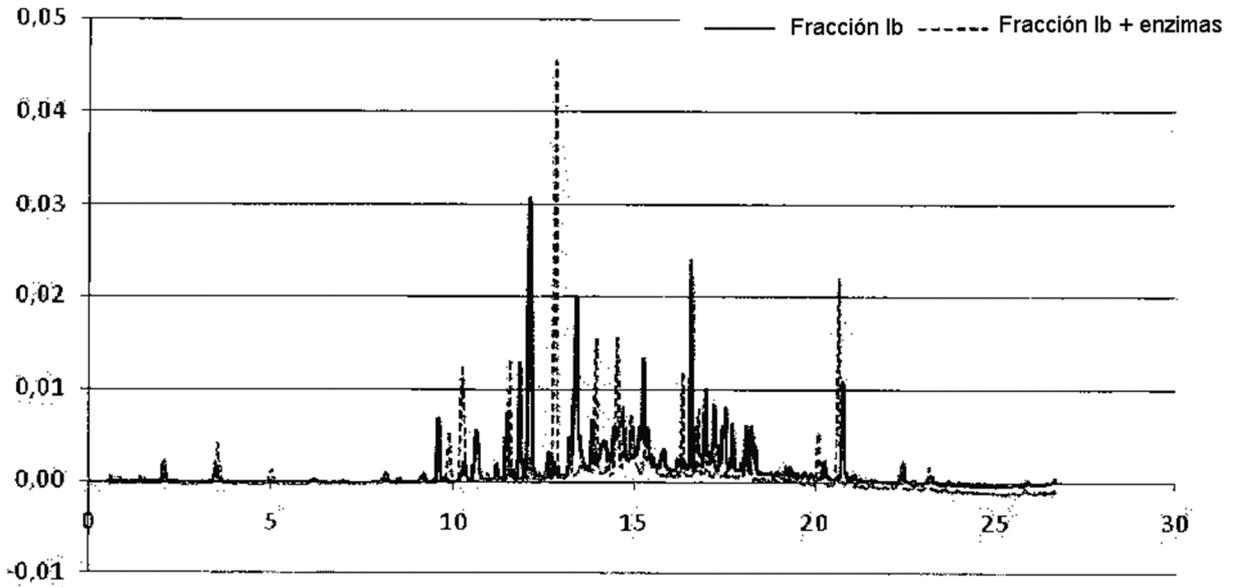


Figura 1

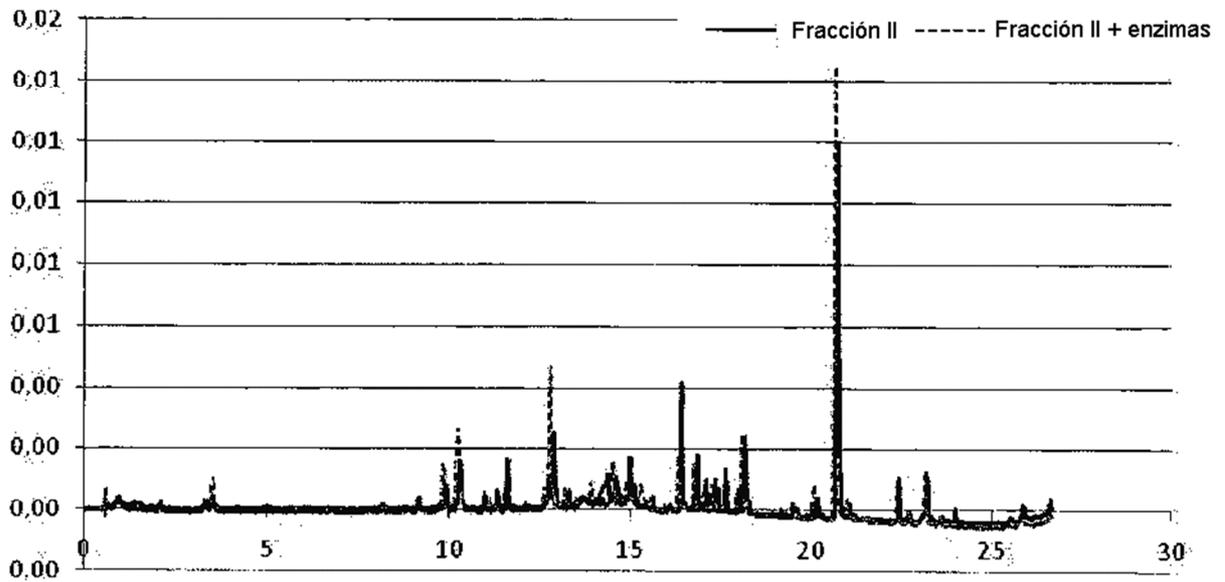


Figura 2

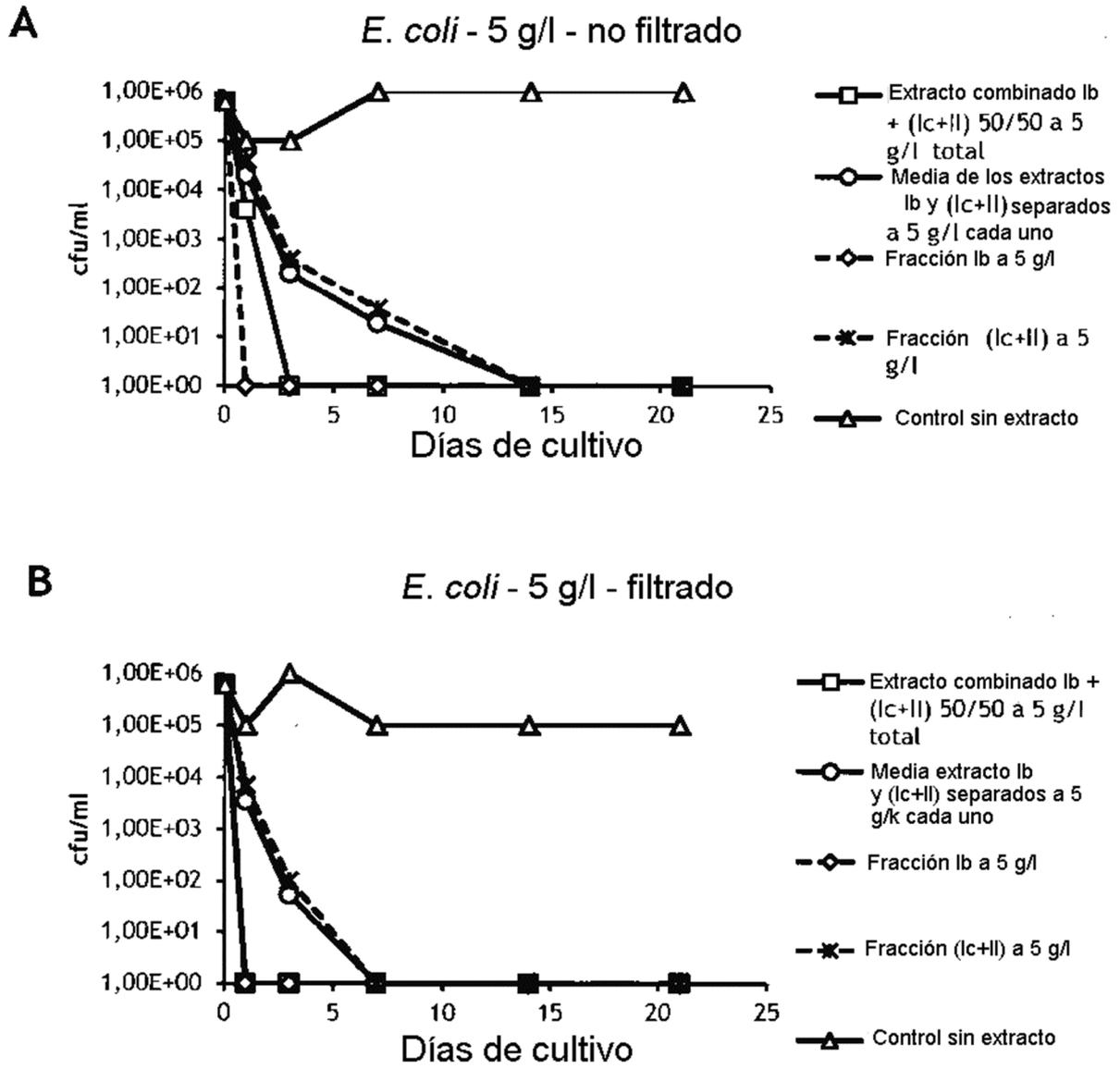


Figura 3

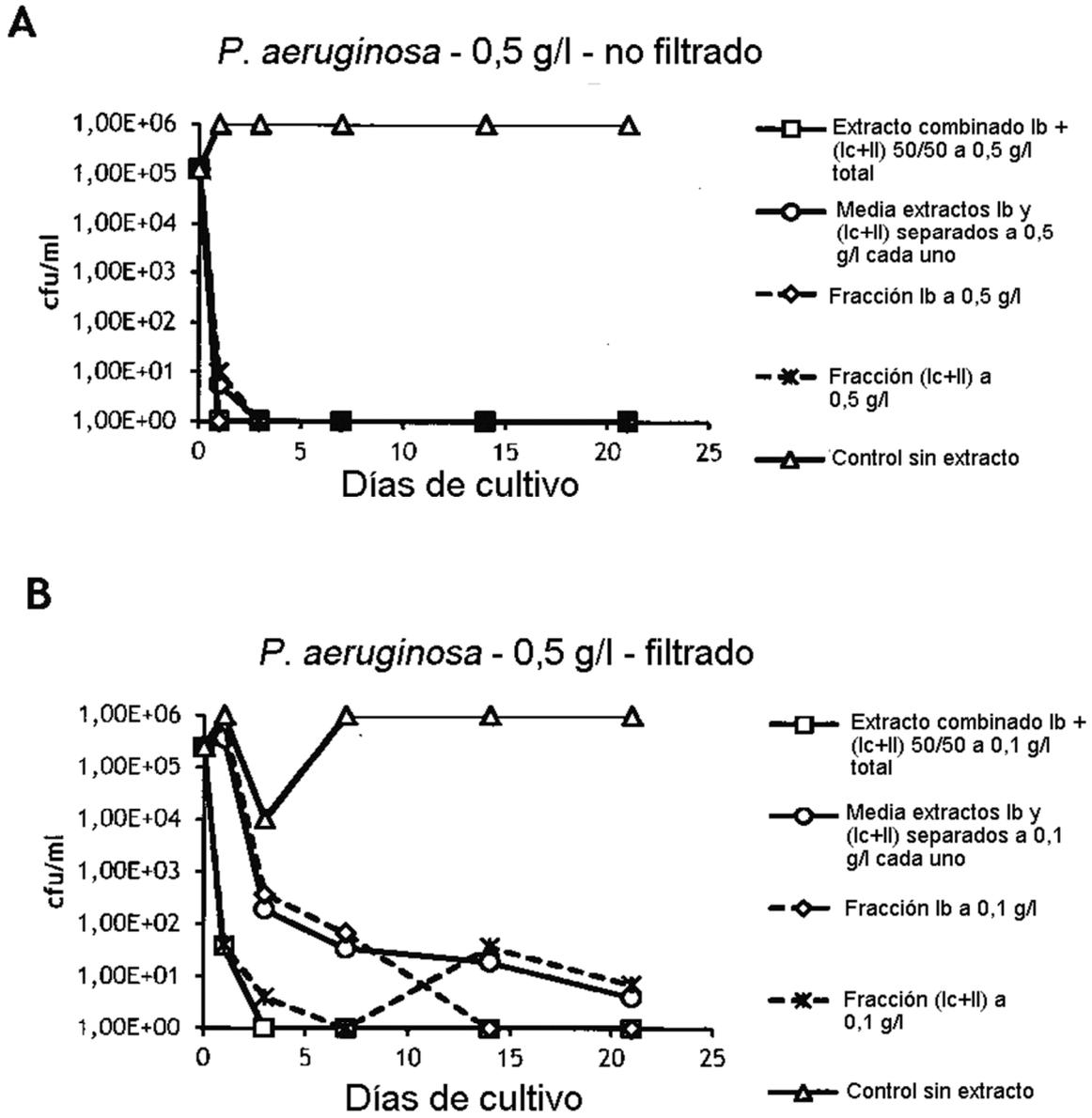


Figura 4

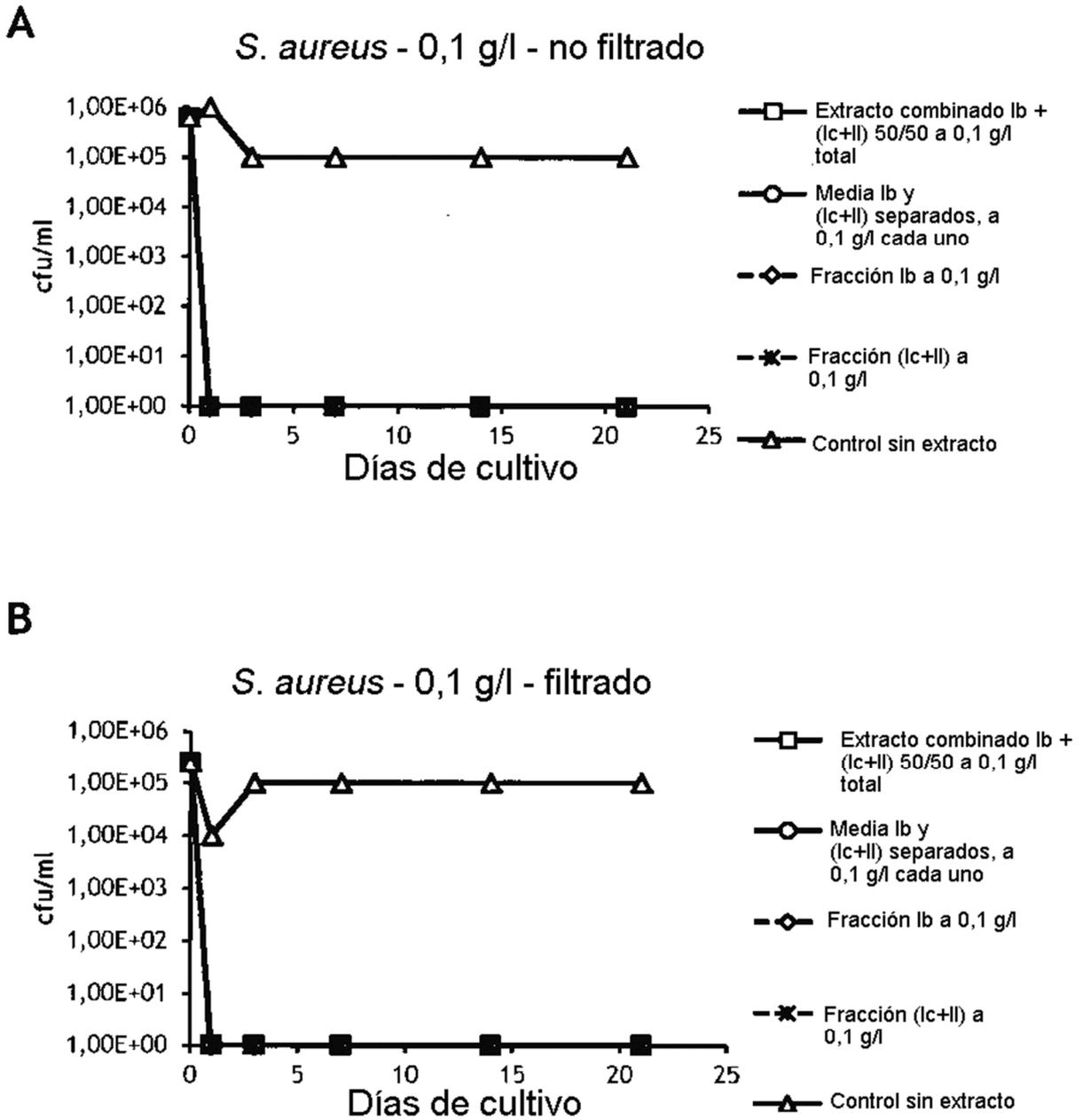


Figura 5

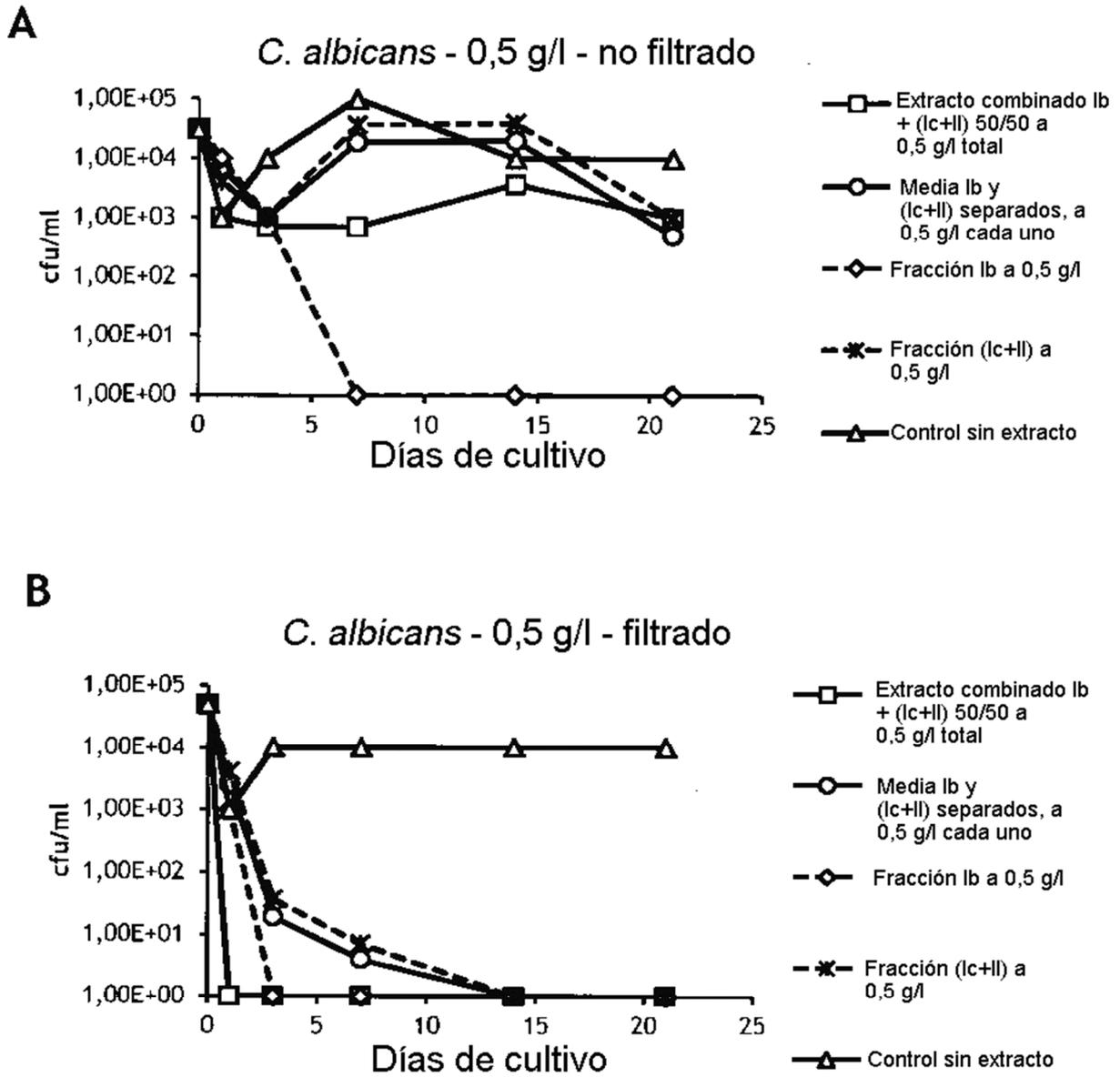


Figura 6