

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 702**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)  
**C12R 1/25** (2006.01)  
**C12R 1/46** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)  
**A23L 33/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2007 PCT/EP2007/007394**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2008 WO08022784**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2007 E 07801823 (1)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2054078**

54 Título: **Composición que comprende flavonoides de absorción duradera**

30 Prioridad:

**24.08.2006 EP 06017678**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.08.2017**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**RICHELLE, MYRIAM;  
WILLIAMSON, GARY;  
JANKOVIC, IVANA y  
REIN, MAARIT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 628 702 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

Composición que comprende flavonoides de absorción duradera

## 5    Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere a una composición de liberación duradera y continua que contiene ramnosa, para mejorar la salud ósea y/o cardiovascular.

## 10   Estado técnico anterior

15    Los flavonoides o bioflavonoides son un grupo ubicuo de sustancias polifenólicas que existen en la mayoría de las plantas y están concentrados en las semillas, en la piel o en la cáscara de los frutos, en la corteza y en las flores. Un gran número de medicinas vegetales contiene flavonoides que han sido citados por muchos autores por tener acción antibacteriana, antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica, antimutágena, antivírica, antineoplásica, antitrombótica y vasodilatadora.

20    En la patente WO 2005/058255 A1 se describen desarrollos recientes que también demuestran los beneficios de las composiciones que contienen flavanonas para mejorar la piel, el cabello y el pelaje de humanos o mascotas.

25    En la naturaleza estos compuestos se presentan principalmente como glicósidos. Esta conjugación con azúcares influye marcadamente en su cinética de absorción. Por ejemplo, los glucósidos flavonoides tienen una absorción rápida y temprana, mientras que los rutinósidos flavonoides (glucósidos de ramnosa) tienen una absorción lenta y tardía.

30    En los mamíferos la biodisponibilidad de rutinósidos flavonoides tales como la hesperidina es lenta y tardía debido a la falta del enzima  $\alpha$ -ramnosidasa en el intestino delgado, que eliminaría la parte de ramnosa de dichos rutinósidos flavonoides. Esto hace que los rutinósidos flavonoides tarden tiempo en avanzar por el tracto gastrointestinal hasta el colon.

35    En la patente JP 2003-073279 se describen alimentos y bebidas saludables que contienen glicósidos flavonoides de acción prolongada, incluyendo en el producto alimenticio una mezcla de flavonoides que tienen varios grados de glicosilación de manera que tenga lugar la absorción a través del tracto gastrointestinal.

40    La patente JP 2000-078955 también describe un modo de mejorar la absorción de los flavonoides en alimentación o en medicina, proporcionando una mezcla de flavonoides fisiológicamente activos y derivados de ellos.

45    Asimismo Espin J.C. y otros describen en el Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(20), p. 6136-6142, la producción de flavonoides glucósidos biodisponibles en zumos de fruta y en té verde, lo cual se logra tratando los zumos de fruta y el té verde con enzimas ramnosidasa procedentes de *Aspergillus aculeatus*.

50    La patente EP-A-0908524 describe un proceso para preparar un producto con elevado contenido de  $\alpha$ -monoglucosil hesperidina, el cual comprende las etapas de poner en contacto glucoamilasa y  $\alpha$ -L ramnosidasa con una solución que contiene  $\alpha$ -glucosil hesperidina y hesperidina, simultánea o aleatoriamente, para obtener una mezcla; cristalizar y separar  $\alpha$ -monoglucosil hesperidina en y de la mezcla y recoger la  $\alpha$ -monoglucosil hesperidina.

55    R. Gonzalez-Barrio y otros: "Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase [*Producción de glucósidos flavonoides biodisponibles en los zumos de fruta y en el té verde mediante el uso de  $\alpha$ -L-ramnosidasa fúngica*]", en el vol. 2152, nº 20, 2004, páginas 6136-6142, revelan un proceso para incrementar la biodisponibilidad de glucósidos flavonoides mediante un tratamiento con una  $\alpha$ -L-ramnosidasa. El proceso implica la presencia en solución de la bebida que contiene flavonoides junto con la ramnosidasa.

60    Inge Lise F. Nielsen y otros: "Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in human: a randomised, double-blind, crossover trial [*La biodisponibilidad en humanos mejora mediante modificación enzimática del flavonoide hesperidina cítrico: ensayo cruzado doble ciego aleatorizado*]", en la revista de nutrición, vol. 136, nº 2, febrero de 2006, páginas 404-408 describen un zumo de naranja que contiene hesperitin-7-glucósido. El producto se obtiene mezclando zumo de naranja que contiene naturalmente hesperidina con una solución de  $\alpha$ -ramnosidasa.

65    El uso de flavonoides que contienen ramnosa para la mejora de la salud ósea y cardiovascular es bien conocido (WOA-2004002496, Hiroshige Chiba y otros: "Hesperidin, a Citrus Flavonoid, Inhibits Bone Loss and Decreases Serum and Hepatic Lipids in Ovariectomized Mice [*Hesperidina, un flavonoide cítrico, inhibe la pérdida ósea y reduce los lípidos en suero e hígado de ratones ovariectomizados*]", en la revista de nutrición, 2003, páginas 1892-1897.

## Objeto de la presente invención

Por lo tanto aún hay necesidad de proponer vías alternativas para que las composiciones de flavonoides tengan un efecto controlado en los mamíferos, mejorando al mismo tiempo la salud ósea y/o cardiovascular.

## Resumen de la presente invención

En consecuencia esta necesidad se resuelve de acuerdo con las características de la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes desarrollan la idea principal de la presente invención.

La presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un flavonoide con ramnosa, y además  $\alpha$ -ramnosidasa encapsulada, para mejorar la salud ósea y/o cardiovascular.

Las composiciones de la presente invención se formulan para uso nutricional y farmacéutico. La presente invención describe una bacteria que posee actividad de  $\alpha$ -ramnosidasa, escogida entre *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus* o *Leuconostoc mesenteroides*.

En la presente invención la  $\alpha$ -ramnosidasa se usa para preparar una composición que lleva al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y que va destinada a mejorar la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de dicho flavonoide.

## Figuras

A continuación se describe más detalladamente la presente invención, haciendo referencia a algunas de sus formas de ejecución mostradas en las figuras adjuntas:

- Figura 1a: representa la estructura molecular de la hesperidina,
- Figura 1b: representa la estructura molecular del hesperetín-7-glucósido,
- Figura 1c: representa la estructura molecular de la hesperetina, y
- Figura 2: representación gráfica comparativa de los niveles de hesperetina en plasma, dependiendo de si solo se ingiere hesperetín-7-glucósido, de si solo se ingiere hesperidina o de si solo se consume una composición según la presente invención.
- Figura 3: muestra la desaparición de hesperidina *in vitro* en condiciones parecidas a las del intestino delgado (pH 6) y en presencia de  $\alpha$ -ramnosidasa pura (CTRL+), en presencia de células intactas de *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 EC), en presencia de células rotas *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 CE) o en ausencia de cualquier bacteria/enzima (CTRL-).
- Figura 4: muestra la formación de hesperetín-7-glucósido a pH 6 (calculada a partir de la cantidad inicial de hesperidina (100%)), donde CTRL+, CTRL-, 907 CE y 907 EC tienen el mismo significado que en la figura 3.
- Figura 5: muestra la formación de hesperetina a pH 6 al tratar hesperidina con células intactas o rotas de *Lactobacillus gasseri* (CNCM I-3795).
- Figura 6: muestra la desaparición de hesperidina *in vitro* en condiciones parecidas a las del estómago después de la digestión de una comida (pH 4) y en presencia de  $\alpha$ -ramnosidasa pura (CTRL+), en presencia de células intactas de *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 EC), en presencia de células rotas *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 CE) o en ausencia de cualquier bacteria/enzima (CTRL-).
- Figura 7: muestra la formación de hesperetín-7-glucósido a pH 4 (calculada a partir de la cantidad inicial de hesperidina (100%)), donde CTRL+, CTRL-, 907 CE y 907 EC tienen el mismo significado que en la figura 3.
- Figura 8: ilustra el resultado del ensayo TIM1. Hidrólisis de hesperidina a hesperetín-7-glucósido controlada durante 3 horas en el estómago y en el intestino delgado, utilizando cepas bacterianas de *Lactobacillus gasseri* (CNCM I-3795). La figura demuestra que los enzimas bacterianos son poco activos en el estómago, solo de manera notable en el intestino delgado, y que la cantidad de hesperidina hidrolizada disminuye a medida que el compuesto baja por el tracto GI.
- Figura 9: ilustra el grado de hidrólisis de hesperidina a hesperetín-7-glucósido al usar el enzima  $\alpha$ -ramnosidasa puro. Este gráfico demuestra que el enzima puro es activo en el estómago, pero no tanto en el GI.

## Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a formas de controlar la absorción de los flavonoides que contienen ramnosa en los mamíferos, de tal modo, que tras la ingestión dichos flavonoides se absorban igualmente en el tracto gastrointestinal superior e inferior o a todo lo largo del mismo.

Así, el principio en que se basa la presente invención para lograr un efecto duradero y regulado es un método para proporcionar de manera regulada un flavonoide en forma al menos parcialmente absorbible a su paso por el tracto gastrointestinal de un mamífero. Normalmente el flavonoide se hidroliza parcialmente en el tracto gastrointestinal superior y también en el colon.

Según la presente invención, la presencia de  $\alpha$ -ramnosidasa en una fase temprana de la digestión (en el estómago, en el intestino delgado) permite hasta cierto punto la escisión parcial de los flavonoides que llevan ramnosa (véanse las figuras 3-9), lo cual da lugar a flavonoides más absorbibles en los comienzos del proceso de digestión. Además los enzimas presentes naturalmente en el colon promueven el proceso de escisión, favoreciendo así una absorción continua de los flavonoides a su paso por el tracto gastrointestinal.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden al menos un flavonoide con ramnosa y una  $\alpha$ -ramnosidasa, que está encapsulada, para usar en el mejoramiento de la salud ósea y/o cardiovascular.

Si se cumplen las condiciones correctas (ambientales, de pH, de temperatura, etc.), los enzimas de  $\alpha$ -ramnosidasa tienen normalmente la capacidad de escindir aquellos substratos que llevan un fragmento de ramnosa.

No obstante, en las composiciones de la presente invención el enzima se halla en un estado que impide de manera fundamental el desarrollo de su propia función. Es solo tras la ingestión de las composiciones que cambia el entorno del enzima, y las nuevas condiciones (pH, temperatura, etc.) permiten que el enzima se vuelva activo y escinda así el fragmento de ramnosa del flavonoide.

Por tanto, en las composiciones de la presente invención la  $\alpha$ -ramnosidasa se encuentra en un estado que impide de manera fundamental la escisión del flavonoide que contiene ramnosa. Solo tras la ingestión de la composición puede la  $\alpha$ -ramnosidasa escindir el flavonoide que contiene ramnosa.

Esta actividad "retardada" de la  $\alpha$ -ramnosidasa asegura que la escisión del flavonoide por la  $\alpha$ -ramnosidasa solo se produzca después de la ingestión. Por lo tanto, la  $\alpha$ -ramnosidasa solo actúa en las condiciones reinantes en el tracto gastrointestinal.

Esto se puede conseguir, por ejemplo, teniendo la  $\alpha$ -ramnosidasa dentro de la composición en unas condiciones en que sea "inactiva", es decir incapaz de escindir el fragmento de ramnosa del flavonoide.

Esto se consigue separando la  $\alpha$ -ramnosidasa del flavonoide dentro de la composición. La separación es de tal tipo que la  $\alpha$ -ramnosidasa no está en contacto directo con el flavonoide.

Según la presente invención la separación se efectúa encapsulando la  $\alpha$ -ramnosidasa por medios conocidos en el estado técnico. Así, el enzima se puede encapsular de modo que solo sea liberado en las condiciones reinantes en el tracto gastrointestinal.

Encapsulando preferiblemente la  $\alpha$ -ramnosidasa en un microorganismo capaz de liberarla, la  $\alpha$ -ramnosidasa no está en contacto directo con el flavonoide dentro de la composición. Esta "bioencapsulación" se puede lograr mediante una cepa de un microorganismo productor de  $\alpha$ -ramnosidasa, manteniéndolo en unas condiciones (actividad acuosa, etc.) tales que el microorganismo presente una tasa metabólica baja o cero. Por lo tanto, bajo tales condiciones en la composición (actividad acuosa, etc.) el microorganismo no libera el enzima. La  $\alpha$ -ramnosidasa está "bioencapsulada" en el interior o en el exterior de las paredes celulares del microorganismo.

El microorganismo productor de  $\alpha$ -ramnosidasa empleado en las composiciones o en los métodos de la presente invención es preferiblemente una bacteria. Con mayor preferencia el microorganismo se escoge del grupo formado por lactobacilos, bífidobacterias, estreptococos, lactococos, enterococos, bacilos, estafilococos, leuconostocos, pediococos, oenococos.

Sobre todo, el microorganismo se selecciona entre *Lactobacillus crispatus* (ATCC 33820), *Lactobacillus crispatus* (CNCM I-3654), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Lactobacillus plantarum* (CNCM I-3653), *Lactobacillus gasseri* (CNCM I-3795) o mezclas de ellos.

Por lo tanto se utiliza un microorganismo con actividad de  $\alpha$ -ramnosidasa seleccionado entre *Lactobacillus crispatus* (ATCC 33820), *Lactobacillus crispatus* (CNCM I-3654), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Lactobacillus plantarum* (CNCM I-3653) o *Lactobacillus gasseri* (CNCM I-3795).

En las composiciones de la presente invención el microorganismo está contenido preferiblemente en una proporción de  $10^9$ - $10^{10}$  ufc/g, con mayor preferencia de  $10^9$  ufc/g.

El microorganismo capaz de producir  $\alpha$ -ramnosidasa está encapsulado. La encapsulación de microorganismos es un método bien conocido del especialista en la materia.

Los flavonoides utilizados en la presente invención se pueden elegir entre cualquier flavonoide que comprenda un fragmento de ramnosa. Cualquiera de estos flavonoides que comprenden ramnosa se puede seleccionar del grupo constituido por hesperidina, rutina, eriotricina, naringina, neohesperidina, diosmina, linarina, poncirina, prunina, etc., y cualquier combinación posible de esta relación que incluya dos o más componentes de la misma. El flavonoide es preferiblemente hesperidina (fig. 1a).

La hesperidina (fig. 1a) contiene un fragmento de rutinosa (ramnosa-glucosa). En presencia de un enzima activo de  $\alpha$ -ramnosidasa el fragmento de ramnosa puede separarse en cierta medida produciendo el hesperetín-7-glucósido

(fig. 1b). A su vez el hesperetín-7-glucósido puede ser escindido por otros enzimas, p.ej. por enzimas glucosidasas presentes en el tracto gastrointestinal, para dar hesperetina (fig. 1c).

5 En la fig. 2 se puede ver, por un lado, que el nivel de hesperetina (fig. 1c) en plasma tras la ingestión de hesperetín-7-glucósido (fig. 1b) presenta un pico agudo poco después de la ingestión. Con independencia de la teoría se piensa que ello es debido a la presencia de enzimas capaces de escindir el fragmento de glucosa, por lo cual la hesperetina es fácilmente absorbible.

10 Por otra parte el nivel de hesperetina en plasma resultante de la ingestión de hesperidina (fig. 1a) solo aparece más tarde y en menor medida. Con independencia de la teoría se piensa que ello es debido a la presencia de enzimas capaces de escindir el fragmento de rutinosa de la hesperidina solamente en un estadio posterior del paso a través del tracto gastrointestinal.

15 Así, las composiciones según la presente invención proporcionan ventajosamente un nivel de hesperetina en plasma que se mantiene durante un periodo más largo de tiempo (véase fig. 2).

20 La cantidad de flavonoide en las composiciones de la presente invención es la correspondiente a una proporción de 0,01 mg hasta 1 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide. Preferiblemente el flavonoide está presente en una proporción de 10 mg hasta 800 mg del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.

25 Por ejemplo, cuando en una composición de la presente invención se usa hesperidina (fig. 1a), ésta se halla en una proporción que aporta 0,01 mg hasta 1 g, preferiblemente 10 mg hasta 800 mg, de la correspondiente hesperetina (fig. 1c), lo cual es fácil de calcular por un especialista en la materia.

En las composiciones según la presente invención la  $\alpha$ -ramnosidasa puede hallarse en una cantidad suficiente para aportar el 10-50% del flavonoide aglicona o de una forma de flavonoide glicosilado que es absorbible en las fases tempranas de la digestión.

30 Por ejemplo, cuando el flavonoide es hesperidina se usa una cantidad de  $\alpha$ -ramnosidasa suficiente para aportar el 10-50% de hesperetín-7-glucósido (fig. 1b) o de hesperetina (fig. 1c) en el tracto gastrointestinal superior (intestino delgado), lo cual se puede medir fácilmente empleando métodos conocidos del estado técnico tales como ensayos con TIM-1 de TNO y confirmación *in vivo* (véanse figs. 8 y 9).

35 Las composiciones según la presente invención se formulan preferiblemente para emplearlas como composiciones nutricionales, farmacéuticas o cosméticas.

Por consiguiente las composiciones según la presente invención pueden ser secas, húmedas o semihúmedas. Se entiende por "secas" las composiciones que tienen una actividad acuosa inferior a 0,6. Por "semihúmedas" las que tienen una actividad acuosa entre 0,6 y 0,9, y por "húmedas" las que tienen una actividad acuosa superior a 0,9.

40 Se pueden elegir entre composiciones líquidas, secas o semisecas tales como soluciones, espráis, polvos, tabletas, cápsulas, yogur, galletas, leche, bebidas, chocolate, helados, copos o barras de cereales para el desayuno, leches en polvo, productos a base de soja, productos lácteos no fermentados, suplementos nutricionales, suplementos alimenticios, comida para mascotas, fórmulas infantiles.

45 Para la ingestión de composiciones orales y en particular de suplementos alimenticios son posibles muchas formas de ejecución. Se formulan mediante los medios usuales para producir tabletas recubiertas de azúcar, cápsulas de gelatina, geles, emulsiones, tabletas, cápsulas o soluciones. En particular los flavonoides que contienen ramosa y la  $\alpha$ -ramnosidasa se pueden incorporar a cualquier otra forma de suplementos alimenticios o alimentos enriquecidos, como por ejemplo barras alimenticias, o a productos en polvo compactados o no. Los polvos se pueden diluir con agua, en una bebida gaseosa, en productos lácteos o en productos derivados de soja o se pueden incorporar a barras alimenticias.

50 Las composiciones pueden contener los excipientes y componentes usuales, p.ej. componentes grasos y/o acuosos, agentes humectantes, espesantes, conservantes, texturizantes, agentes saborizantes y/o cubrientes, antioxidantes, colorantes usuales en el sector alimenticio.

55 La  $\alpha$ -ramnosidasa se debe emplear en la preparación de una composición que comprenda al menos un flavonoide con contenido de ramosa y en la cual la  $\alpha$ -ramnosidasa esté encapsulada, con el fin de mejorar la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de dicho flavonoide. Se entiende por "composición" cualquiera que sea conforme a la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente. La bioeficacia se define como la proporción de la nutriente ingerida convertida en una forma activa del nutriente que tiene un efecto biológico significativo. Está muy relacionada con la biodisponibilidad, la cual se define como el grado de absorción de una sustancia hacia la circulación sistémica. Mejorando la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de un flavonoide, la presente invención proporciona la ventaja de una composición más efectiva, cuyos efectos son más duraderos y sostenidos.

65

Una comparación de los niveles en plasma tras la ingestión de hesperidina (fig. 1a) o tras la ingestión de hesperetín-7-glucósido (fig. 1b) muestra una diferencia notable respecto a las composiciones según la presente invención. De hecho, tras la ingestión de las composiciones de la presente invención, los niveles de hesperetina en plasma se mantienen durante un periodo de tiempo prolongado (fig. 2). La presente invención prolonga además los niveles en plasma de los metabolitos de los flavonoides que contienen ramnosa, después de la ingestión de dicho flavonoide, la cual incluye la etapa de administrar una composición por vía oral que contiene al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y  $\alpha$ -ramnosidasa, de modo que dicha  $\alpha$ -ramnosidasa está encapsulada.

La  $\alpha$ -ramnosidasa se puede administrar aparte de la composición que lleva el flavonoide con ramnosa. Por ejemplo, dicha  $\alpha$ -ramnosidasa se puede proporcionar en forma de una tableta, cápsula, etc. para ser ingerida al mismo tiempo que la composición que lleva el flavonoide. Como alternativa se puede ofrecer, por ejemplo, en forma de polvos para esparcir sobre la composición que contiene el flavonoide. El especialista puede imaginar fácilmente una variedad de distintas alternativas a las formas de ejecución aquí citadas.

Las composiciones de la presente invención empleadas para el mejoramiento de la salud ósea y/o cardiovascular se administran oralmente por separado o simultáneamente con dicha  $\alpha$ -ramnosidasa, la cual está encapsulada. Debe entenderse que el concepto de la presente invención también es aplicable como una terapia coadyuvante de las medicaciones empleadas actualmente. Como las composiciones de la presente invención se pueden administrar fácilmente por vía oral junto con los alimentos, es posible suministrar una comida clínica especial que contenga una gran cantidad de las sustancias que son objeto de la presente invención.

La presente invención se ilustra con más detalle mediante los ejemplos no limitativos descritos a continuación.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### Materiales

Hesperidinasa "Amano" Conc. (A. MANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

#### Escisión de hesperidina *in vitro* mediante extractos bacterianos crudos

Para comprobar si las alfa-ramnosidasas bacterianas pueden reconocer y escindir hesperidina como sustrato, los extractos crudos de las células cultivadas en presencia de ramnosa se incuban con hesperidina a pH 4 y a pH 6 durante 4 horas y 8 horas y el análisis se realiza por HPLC. Los resultados se muestran en la tabla siguiente como porcentaje de hesperidina o sus derivados respecto a las cantidades totales de hesperidina al inicio de la reacción (0,08 mg/ml). Los ensayos se efectuaron con 0,08 mg de hesperidina/ml - que es la concentración aproximada de hesperidina pretendida para el producto final - y extractos crudos de  $3 \times 10^9$  bacterias/ml.

Los resultados demuestran que las dos cepas tienen actividad  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa y que por lo tanto dividen la hesperidina en hesperetín-7-glucósido y aglicona en diferentes medidas, dependiendo de las condiciones de reacción. Los resultados sugieren que las bacterias se pueden emplear para transformar parcialmente *in situ* hesperidina en hesperetín-7-glucósido y aglicona.

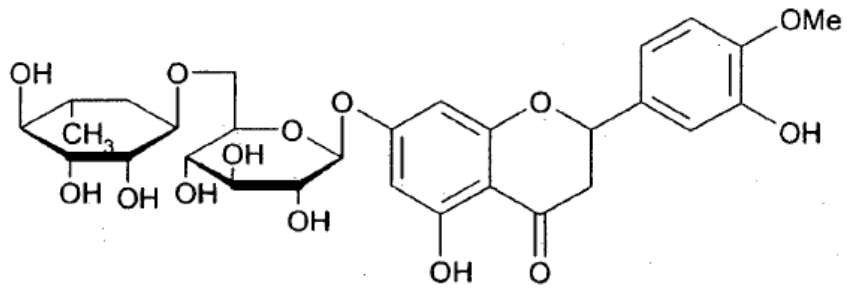
%		Recuento bacteriano	Hesperidina		Hesperetín-7-glucósido		Aglicona	
			4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h
Control (-) (sin enzimas)	pH 4	-	nd	95	nd	0	nd	0
	pH 6		nd	95	nd	0	nd	0
Control (+) pH4 (hesperidinasa) pH6	pH 4	-	0	0	92	93	0	0
	pH 6		66	49	25	40	0	0
<i>L. acidophilus</i> NCC 3010	pH 4	$3,4 \times 10^9$	18	5	28	18	26	42
	pH 6		26	10	6	5	13	27
<i>L. plantarum</i> NCC1313	pH 4	$3,4 \times 10^9$	12	8	5	4	62	66
	pH 6		9	0	5	0	25	33
Nd: no determinado								

#### Ejemplo 2

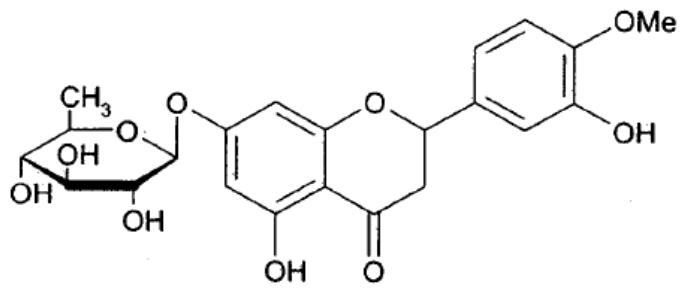
Se mezclan 0,2 a 50 mg de hesperidina/g de producto con  $10^7$ - $10^{10}$  ufc/(g de producto) de bacterias con actividad alfa-ramnosidasa. La mezcla resultante se combina con un vehículo adecuado. Los vehículos se pueden elegir entre leche fermentada, yogur, queso fresco, leche cuajada, barritas dulces, copos o barras de cereales para el desayuno, bebidas, leche en polvo, productos a base de soja, productos lácteos no fermentados.

**REIVINDICACIONES**

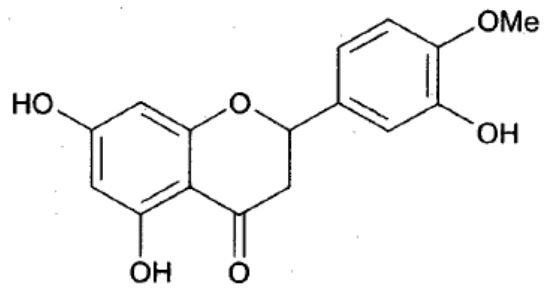
- 5 1. Composición que incluye al menos un flavonoide con ramnosa y  $\alpha$ -ramnosidasa, en la cual la  $\alpha$ -ramnosidasa está encapsulada, para usar en el mejoramiento de la salud ósea y/o cardiovascular.
2. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual la  $\alpha$ -ramnosidasa está encapsulada en un microorganismo capaz de producir  $\alpha$ -ramnosidasa.
- 10 3. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el microorganismo es una bacteria.
4. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en la cual el microorganismo está seleccionado del grupo formado por lactobacilos, bifidobacterias, estreptococos, lactococos, enterococos, bacilos, estafilococos, leuconostocos, pediococos, oenococos.
- 15 5. Composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la cual el microorganismo está seleccionado entre *Lactobacillus crispatus* ATCC33820, *Lactobacillus crispatus* CNCM I-3654, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, *Lactobacillus plantarum* CNCM I-3653, *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 o mezclas de ellos.
- 20 6. Composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la cual el microorganismo está presente en una proporción de  $10^6$ - $10^{10}$  ufc/g.
7. Composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la cual el microorganismo capaz de producir  $\alpha$ -ramnosidasa está encapsulado.
- 25 8. Composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el flavonoide es hesperidina.
- 30 9. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en la cual la  $\alpha$ -ramnosidasa está presente en una cantidad suficiente para aportar un 10-50% de hesperetín 7-glucósido o de hesperetina en el tracto gastrointestinal superior.
10. Composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el flavonoide que contiene ramnosa está presente en una cantidad correspondiente a una proporción de 0,01 mg hasta 1 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.
- 35 11. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en la cual el flavonoide que contiene ramnosa está presente en una cantidad correspondiente a 10 mg hasta 800 mg del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.
- 40 12. Composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionada entre composiciones líquidas, secas o semisecas tales como soluciones, espráis, polvos, tabletas, cápsulas, yogur, galletas, leche, bebidas, chocolate, helados, copos o barras de cereales para el desayuno, leches en polvo, productos a base de soja, productos lácteos no fermentados, suplementos nutricionales, suplementos alimenticios,
- 45 comida para mascotas, fórmulas infantiles.



**Figura 1a**



**Figura 1b**



**Figura 1c**



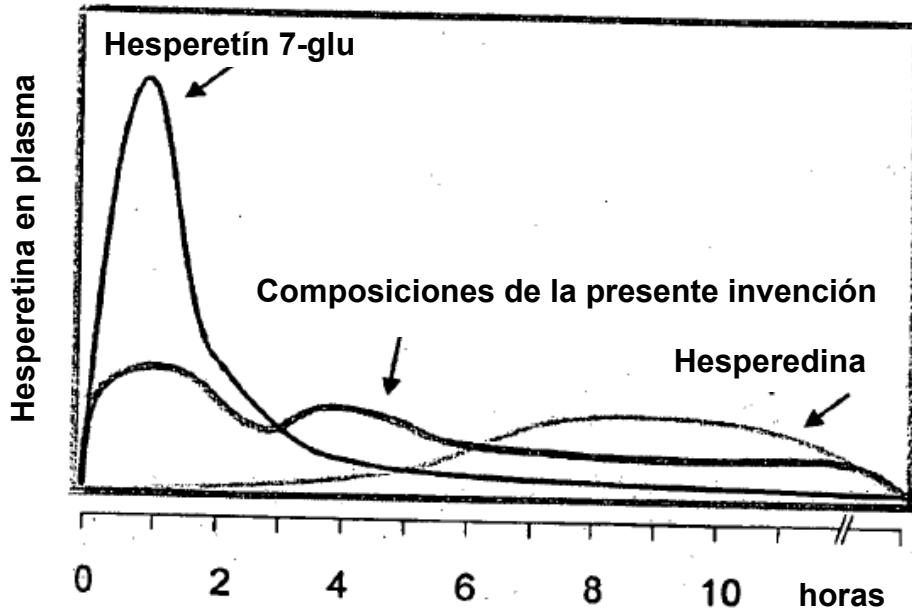


Figura 2

Desaparición de hesperidina a pH 6

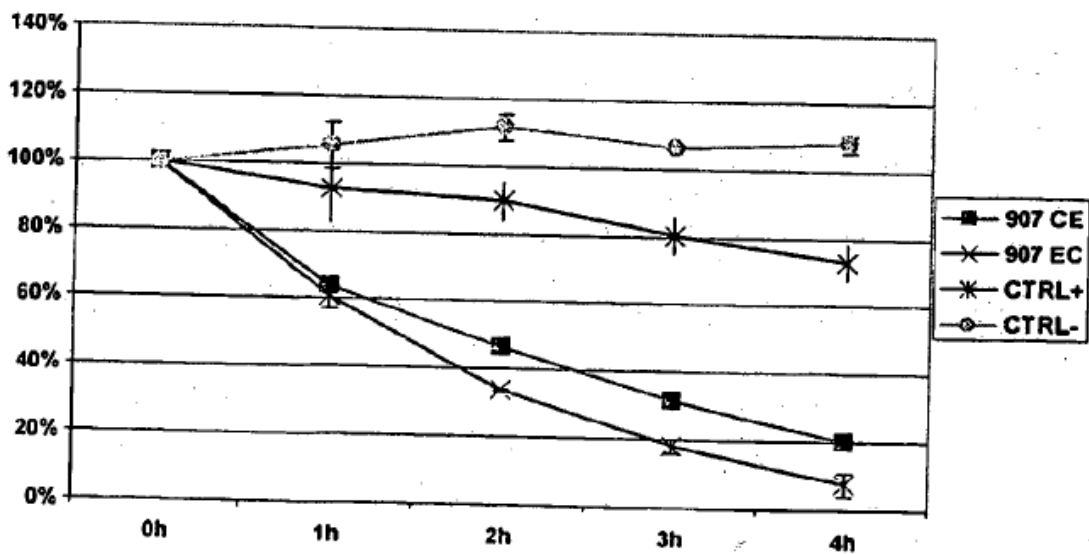


Figura 3

Formación de hesperetina 7-glucósido a pH 6

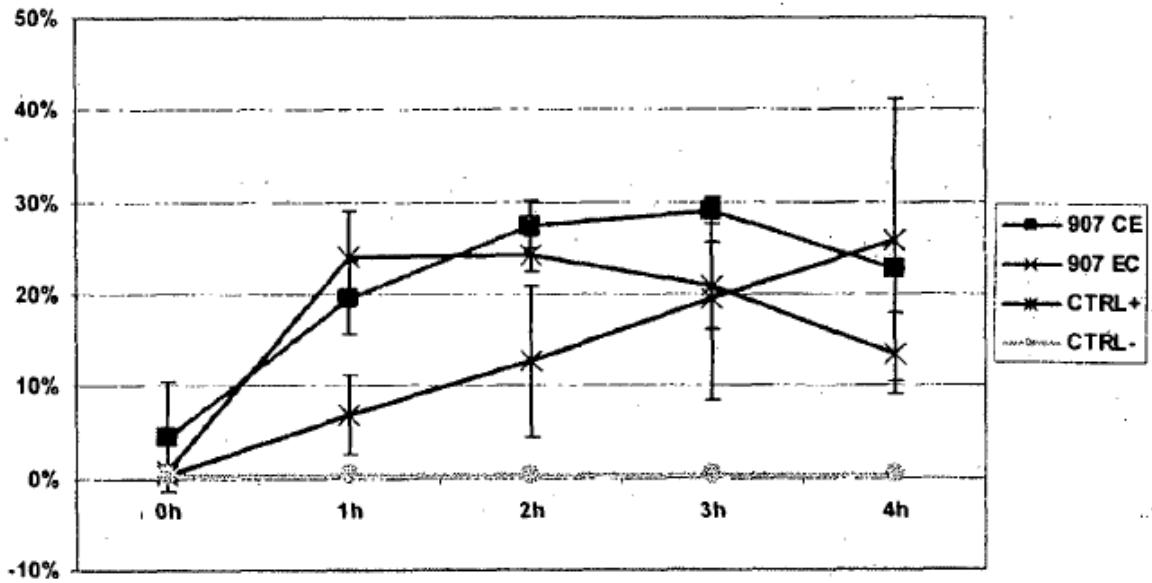


Figura 4

Formación de hesperetina a pH 6

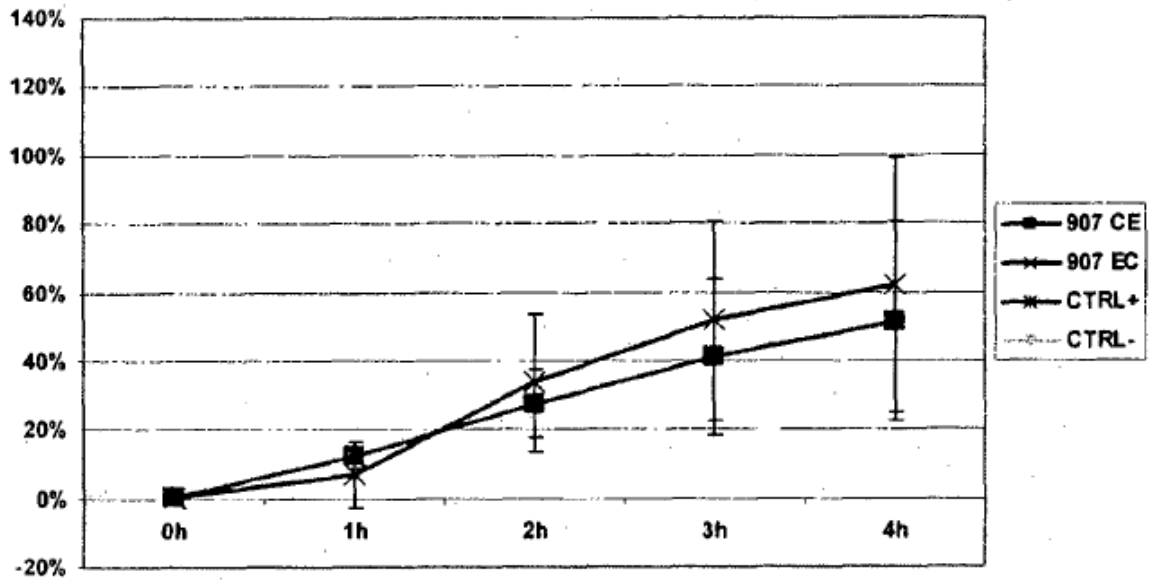


Figura 5

Desaparición de hesperidina a pH 4

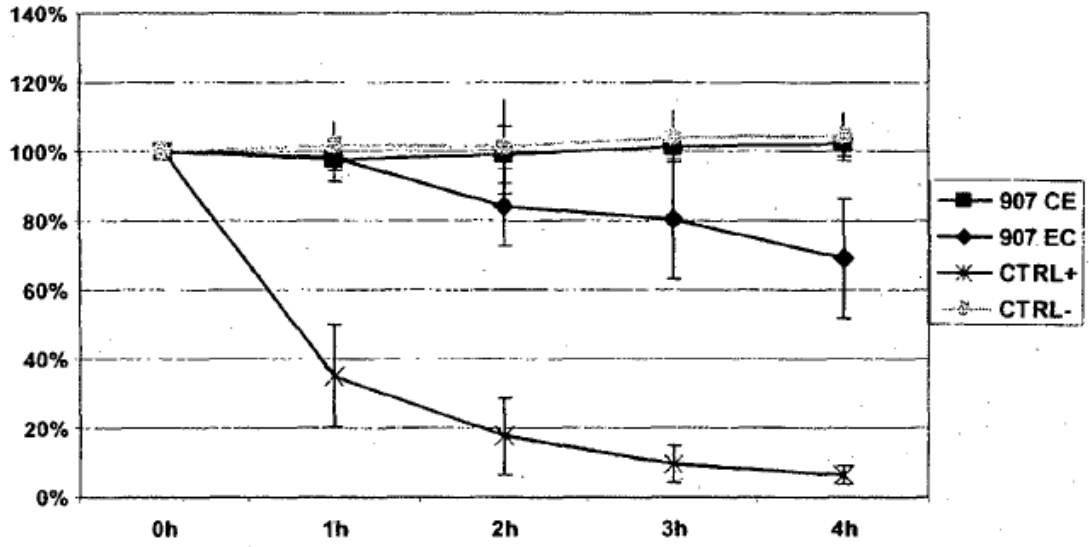


Figura 6

Formación de hesperetín 7-glucósido a pH 4

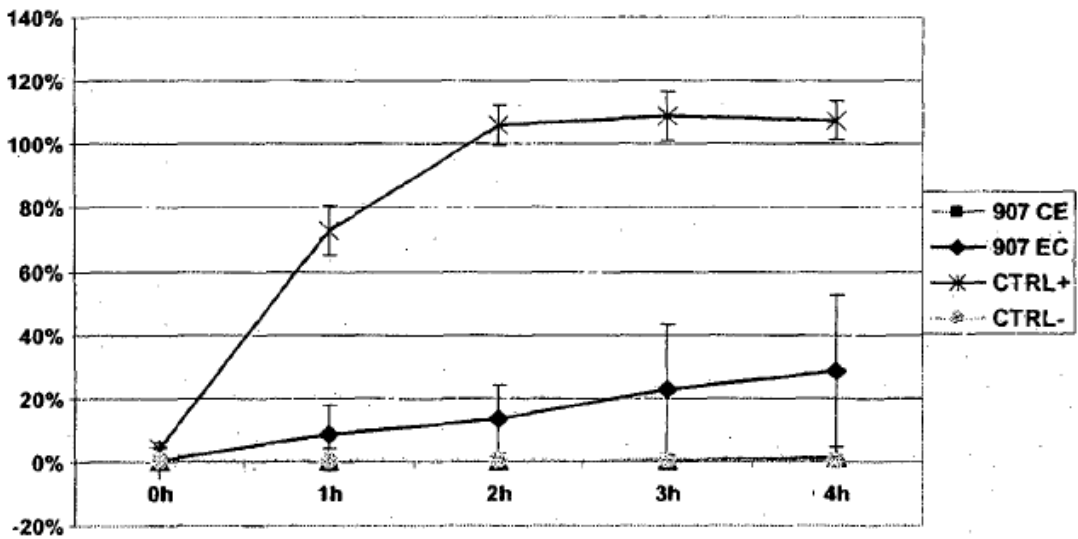


Figura 7

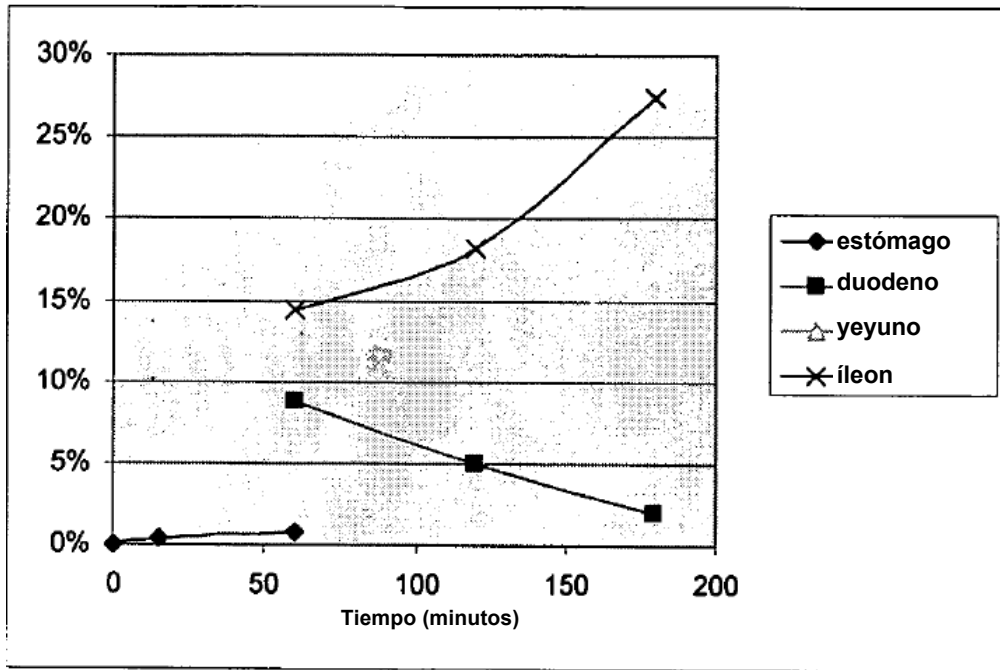


Figura 8

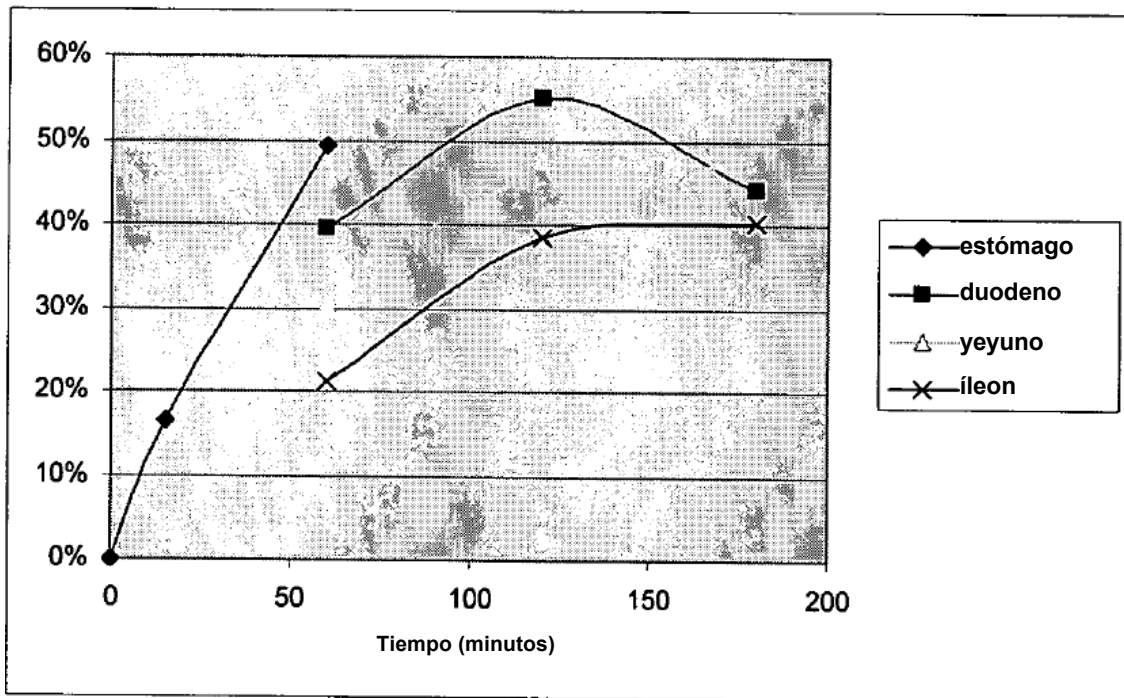


Figura 9