

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 344**

51 Int. Cl.:

A61Q 5/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61Q 5/02 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2004 PCT/EP2004/014416**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2005 WO05058255**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2004 E 04804019 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 1750651**

54 Título: **Composición que contiene flavononas, para la mejora de la salud de la piel y del pelo, y del pelaje**

30 Prioridad:

18.12.2003 EP 03029183

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RICHELLE, MYRIAM;
 OFFORD-CAVIN, ELIZABETH;
 BORTLIK, KARLHEINZ;
 BUREAU-FRANZ, ISABELLE;
 WILLIAMSON, GARY;
 NIELSEN, INGE, LISE;
 STEILING, HEIKE y
 MOODYCLIFFE, ANGUS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 658 344 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 contiene flavononas, para la mejora de la salud de la piel y del pelo, y del pelaje

5 La presente invención, se refiere a una composición para, la prevención, la reducción y / o el tratamiento de los
desórdenes o trastornos de la piel, y del pelo / pelaje, o de los daños causados en éstos, tal y como sucede
mediante las reacciones inflamatorias, los factores medioambientales, el envejecimiento o el cáncer. De una forma
particular, la presente invención, se refiere al uso de compuestos consistentes en la flavononas o los derivados de
10 éstas, en composiciones nutricionales, cosméticas o farmacéutica, para la mejora de las condiciones de la piel y del
pelaje, en un ser humano, o en un animal de compañía o doméstico.

Antecedentes y trasfondo de la invención

15 El tejido epitelial más importante o prominente, en los seres vivos, es el consistente en la piel, la cual representa el
órgano más grande en el organismo. El sistema del integumento de la piel, el cual se encuentra compuesto por la
epidermis, la dermis y el estrato córneo, se correlaciona con aquéllos de los órganos internos, y éste interactúa, de
una forma concurrente o conjuntamente con las partes circundantes del entorno que lo rodea. Siendo éste la interfaz
entre el entorno medioambiental y el organismo, en sí mismo, la piel, se encuentra fuertemente influenciada por los
factores externos, y así mismo, también, por los parámetros variables del sistema interno del organismo. Los
20 mecanismos reguladores de la piel, necesitan, así, por lo tanto, ser siempre activos, para inducir los cambios
sistemáticos, los cuales sean necesarios para mantener los eventos patológicos concernientes a la morfología y a
las actividades del integumento de la piel.

25 Debe conseguirse un gran acuerdo sobre los procesos los cuales aseguren el adecuado consumo de la abundancia
incrementada de las sustancias energéticas y plásticas, en concordancia con la necesidades de la piel, los cuales
sean garantes de la estabilidad morfológica y funcional de las estructuras de la piel. Así, de este modo, el estado de
los integumentos, determina la realización de los procesos necesarios para la viabilidad y la actividad de las células
de la piel, los cuales conduzcan a la presencia de peculiaridades de la piel, tales como las consistentes en la función
de barrera, en elasticidad, en las propiedades de turgencia, en la humedad, en la pigmentación, etc.

30 Durante tiempo de vida de un ser viviente, aparecen diferentes signos, característicos del envejecimiento, en la piel
o en el pelo, siendo, los signos clínicos principales, la apariencia de líneas finas y de arrugas profundas, las cuales
se incrementan, de una forma acentuada, con la edad, la pérdida del pelo, la densidad reducida del pelo, la
brillantez, el color, la estructura grasienta, el diámetro de las fibras, etc.

35 Estos signos del envejecimiento, se fomentan, así mismo, también, mediante la exposición de la piel y del pelo, a las
influencias exógenas, tales como, por ejemplo, las consistentes en la radiación UV, en los agentes contaminantes,
en los radicales libres, o en las sustancias químicas.

40 En el arte especializado de la técnica, se han venido proponiendo diversos medios para prevenir o evitar los efectos
destructivos del entorno medioambiental, o del envejecimiento, en las células epiteliales. Así, por ejemplo, los
medios para prevenir o evitar el deterioro de la piel, o el envejecimiento de ésta, son, por ejemplo, los consistentes
en proporcionar compuestos secuestrantes de los radicales libres. A este respecto, el documento de patente
europea EP 0 761 214, da a conocer extinguidores de átomos en estado de singletes, de oxígeno, los cuales
45 comprenden derivados de anilina y derivados de difurfurilamina, los cuales, según se reporta, reducen el estrés
oxidativo de la piel.

50 Si bien existe una gran diversidad de compuestos activos, para la mejora de la salud de la piel y del pelo, o del
pelaje, existe todavía una necesidad, en el arte especializado de la técnica, en cuanto al hecho de poder disponer de
nuevos compuestos activos. De una forma particular, un objeto de la presente invención, es el de proporcionar
compuestos, las cuales puedan utilizarse durante un prolongado transcurso de tiempo, por parte de los seres
humanos o por parte de los animales de compañía o domésticos, y los cuales sean susceptibles de poderse
proporcionar en la forma de un suplemento nutritivo, tal como, por ejemplo, una composición nutritiva.

55 Resumen de la invención

60 En un primer aspecto, la presente invención, se refiere a una composición nutritiva, cosmética o farmacéutica, para
la administración oral, para un ser humano, o para animales de compañía o domésticos, la cual contiene, como
compuesto activo, por lo menos un compuesto de flavonona, la cual es la hesperidina, para su uso para la
prevención y / o el tratamiento de la inflamación de la piel.

65 En otro aspecto, la presente invención, proporciona el uso oral, no terapéutico, de por lo menos un compuesto de
flavonona, el cual consiste en la hesperidina, para mejorar la hidratación, la firmeza o la elasticidad de la piel. La
presente invención, proporciona, así mismo, también, el uso oral, no terapéutico, de por lo menos un compuesto de
flavonona, seleccionado de entre la esperetina y la esperetin-7-O-glucoronida, para reducir los signos del
envejecimiento de la piel. La presente invención, proporciona, así mismo, también, una composición para la

administración oral, la cual contiene, como agente activo, por lo menos un compuesto de flavonona, el cual se selecciona de entre la esperetina y la esperetin-7-O-flucuronida, para su uso para prevenir o evitar, aliviar o tratar los desórdenes o trastornos de la piel, o los daños producidos en ésta, mediante una situación de estrés, tal como la consistente en un estrés químico, biológico o físico, en una exposición a los oxidantes o a los carcinógenos, o en una exposición a la radiación UV.

La composición en concordancia con la presente invención, puede ser en forma de un fórmula nutritiva completa, en forma de un suplemento dietético para ser administrado oralmente, a un ser humano o un animal, o en un compuesto para su uso farmacéutico.

La administración a un ser humano o a un animal de compañía o doméstico, de una composición tal y como la que se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, tiene como resultado una salud mejorada de la piel, tal como por ejemplo, la consistente en la fotoprotección, en la hidratación, en la desecación, en la firmeza, en el espesor, en la elasticidad, en una pigmentación regular, en la inmunidad, o en la salud del pelo y del pelaje, tal como, por ejemplo, la mejora de la brillantez del pelo y del pelaje, en la mejora de la densidad del pelo, en la mejora del color, en la mejora de la estructura grasienta, en la mejora del diámetro de la fibra del pelo, en la mejora de la producción de sebo, en la mejora de la brillantez, y la prevención de la pérdida del pelo o del pelaje. Se describe así mismo, también, una composición para su administración a un ser humano o a un animal, para mejorar el estatus antioxidante, para mejorar la función de barrera, o para modular el estatus antioxidativo, para mejorar la función de barrera, o para prevenir o modular el estatus oxidativo, la producción o la composición del sebo, o para reducir los signos del envejecimiento. Ésta ayuda así mismo, también, a reducir los riesgos de sufrir de un cáncer, o de una inflamación.

Descripción resumida de la invención

En concordancia con el primer objeto de la invención, ésta proporciona una composición nutritiva, cosmética, o farmacéutica, para la administración oral, para un ser humano, o para animales de compañía o domésticos, la cual contiene, como compuesto activo, por lo menos un compuesto de flavonona, el cual consiste en la hesperidina, para su uso en la prevención y / o el tratamiento de la inflamación de la piel.

Los compuestos de flavonona los cuales son de interés, son los consistentes en los glucósidos, los cuales pueden encontrarse, principalmente, por ejemplo, en la frutas del género Citrus (agrios o cítricos), tales como los consistentes en las naranjas, en los limones, en la naranjas amargas, en los pomelos, o en una extensión menor, en otros vegetales. Éstos se encuentran presentes, en mayor cantidad, en la piel de la fruta, aunque no obstante, éstos se encuentran así mismo presentes, también, en grandes cantidades, en la pulpa, y también en el jugo de la fruta de los cítricos o agrios (Citrus). Los compuestos en concordancia con la presente invención, pueden ser los consistentes en la hesperidina, por ejemplo, y sus derivados, seleccionados de entre la formas de aglicona, en las formas de calcona, en las formas glicosiladas, o en las formas metiladas. Así mismo, también, se utilizan sus formas sulfatadas o glucuronidadas, las cuales son formas que se encuentran, como producto del metabolismo, en la sangre.

En un último aspecto, los derivados, pueden obtenerse mediante una diversidad de procedimientos, los cuales son bien conocidos en el arte especializado de la técnica, tales como los consistentes en los tratamientos enzimáticos. Así, por ejemplo, la glucosa-7-hesperitina, se prepara un tratamiento con ramnosidasa o con hesperidinas.

El compuesto de flavonona o derivado de ésta, en concordancia con la presente invención, puede incluirse en cualquier tipo de composición, la cual sea apropiada para administrar la sustancia en cuestión, a un individuo, de una forma particular, una composición alimenticia, una composición cosmética o una composición farmacéutica.

En una forma preferida de presentación de la presente invención, se procede a la preparación de una composición alimenticia para su consumo por parte de un ser humano. La composición en cuestión, puede ser la consistente en una fórmula nutritiva, completa, en un producto lácteo, en una bebida fría o autoestable, en una sopa, en un suplemento dietético, en un reemplazante de una comida, y en una barra nutritiva, o en un producto de confitería o pastelería. La composición en cuestión, puede seleccionarse de entre el grupo consistente en la leche, o en los productos lácteos fermentados, tales como, por ejemplo, los consistentes en el yogurt, en la cuajada o el requesón, en los productos fermentado a base de leche, en las cremas heladas, en las materias en polvo a base de leche, en las fórmulas para niños pequeños o lactantes, en los productos a base de cereales y los productos fermentados a base de cereales, en las bebidas, en el agua mineral, en el chocolate, o en los productos alimenticios para animales domésticos o de compañía, los cuales contengan por lo menos un compuesto de flavonona o uno de sus derivados. Los suplementos nutritivos para la administración oral, pueden ser en forma de cápsulas, en forma de cápsulas blandas, en forma de tabletas, en forma de pastas o pastillas, en forma de chicles o gomas, en forma de soluciones bebibles, o en forma de emulsiones. Los procedimientos para la preparación de los suplementos nutritivos en cuestión, pertenecen a una técnica usual, y éstos son bien conocidos en el arte especializado de la técnica,

Tal y como se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, los compuestos de flavononas, se encuentran, de una forma natural, en las frutas pertenecientes al género de los cítricos o agrios

(Citrus), encontrándose, éstos, de una forma particular, en las naranjas, en los limones, y en los pomelos, en su piel, o en su pulpa. De una forma correspondientemente en concordancia con ello, en un primer aspecto de la presente invención, la composición nutritiva en cuestión, puede ser en forma de un jugo de tales tipos de frutas, o en forma de un concentrado. Así, de este modo, la composición nutritiva en concordancia con la presente invención, puede ser

5 en forma de cualquier tipo de producto, de una forma particular, en la forma de una bebida, en la forma de un jugo de cítrico a agrio, o en forma de cualquier otro extracto, procedente de la piel, de la pulpa de frutas cítricas o agrios.

En otra forma de presentación de la presente invención, un producto alimenticio usual, puede encontrarse enriquecido con las flavononas, de una forma preferible, en forma de un extracto de cítricos o agrios. Así, por ejemplo, el producto alimenticio usual, puede ser el consistente en una leche fermentada, en un yogur, en un queso fresco, en una leche cuajada, en una barra de confitería o pastelería, en copos o barras de cereales para desayunos, en una bebida, en la leche en polvo, en los productos a base de soja, en los productos fermentados, no lácteos, o en los suplementos nutritivos para la nutrición clínica. De una forma particular, un procedimiento para la preparación de un extracto enriquecido de flavononas, de una forma particular, hesperidina, a partir de la naranja y del limón, es la que se encuentra descrita en los documentos de patente estadounidenses U S nº 2. 400. 693 y U S nº 2. 442. 110, respectivamente.

10
15

En concordancia con un aspecto adicional de la presente invención, los compuestos de flavononas a ser incluidos en la especificación de este documento de solicitud de patente, pueden producirse de una forma sintética.

20 Una composición nutritiva en concordancia con la presente invención, puede comprender compuestos de flavonona, sus derivados, o mezclas de entre éstos, en una cantidad la cual se encuentre adaptada para una administración oral, diaria, y en una cantidad correspondiente a valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. 0,01 mg hasta aprox. 1 g, de equivalente de aglicona, del compuesto de flavonona, siendo dicha cantidad

25 equivalente de aglicona, del compuesto de flavonona, de una forma preferible, la correspondiente a valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. 0,1 mg hasta aprox. 800 mg, y de una forma más preferible, la correspondiente a valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aprox. 10 mg hasta aprox. 800 mg.

30 Las flavononas en concordancia con la presente invención, pueden utilizarse, bien ya sea solas, o bien ya sea en asociación con otros compuestos activos, tales como los consistentes en la vitamina C, en la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), en los carotenoides (carotenos, lisocopeno, luteína, zeaxantina, beta-criptoxantina, etc., en las ubiquinonas (tal como, por ejemplo, la CoQ10), en las catequinas (tal como, por ejemplo, el galato de epigatolocatequina, en los extractos de café que contengan polifenoles y / o diterpenos (tal como, por ejemplo, los consistentes en el kawheol y en el cafestol), en los extractos de achicoria, en los extractos de ginkgo biloba, en los extractos de uva o de semilla de uva, en los extractos ricos en proantocianidinas, en los extractos de especias (tal como, por ejemplo, el consistente en el extracto de romero), en los extractos de soja, los cuales contengan isoflavonas, y fitoestrógenos relacionados y otras fuentes de flavonoides con actividad antioxidante, en los ácidos grasos, tales como, por ejemplo, los consistentes en los ácidos grasos n-3, en las fibras prebióticas, en los microorganismos probióticos, en la taurina, en el resveratrol, en los aminoácidos, en el selenio y en los precursores del glutatión, por ejemplo.

35
40

En otra forma de presentación, en concordancia con la presente invención, puede procederse a la administración de una composición farmacéutica, para tratamientos profilácticos y / o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones, se administran un paciente, el cual esté sufriendo ya de una enfermedad, tal y como las que se describirán aquí, posteriormente, más abajo, en este documento de solicitud de patente, en una cantidad suficiente, como para curar, o para parar, por lo menos parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad apropiada para cumplir con esta premisa, se define aquí, en este documento de solicitud de patente, como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para cumplir con esta premisa, dependen de la severidad de la enfermedad del paciente, así como de su peso, y de su estado general.

45
50

En las aplicaciones profilácticas, las composiciones en concordancia con la presente invención, se administran a un paciente susceptible de sufrir de una enfermedad en particular, o de otro modo, que se encuentre en riesgo de sufrir de una enfermedad en particular. Una cantidad de este tipo, se define como siendo una "dosis profilácticamente efectiva". En este uso, en concordancia con la presente invención, la cantidad efectiva en cuestión, depende, otra vez, del estado de salud del paciente, así como del peso de éste. De una forma preferible, para los seres humanos, la composición farmacéutica en concordancia con la presente invención, comprende una cantidad de compuestos de flavonona, de sus derivados, o de una mezcla de éstos, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, para una administración diaria, correspondiente a una cantidad comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los aprox. 0,01 mg, hasta los 500 mg. Cuando la composición en cuestión, se administra diariamente a los animales, entonces, la cantidad a administrar diariamente de la composición en cuestión, puede ser la consistente en una cantidad comprendida dentro de unos márgenes situados entre 1 mg y 500 mg, de equivalente de aglicona, de los compuestos de flavonona.

55
60

Los compuestos de la presente invención, se administran, de una forma preferible, con un portador o soporte farmacéuticamente aceptable, definiendo, la naturaleza del portador o soporte en cuestión, en dependencia del modo

65

de administración, tal como, por ejemplo, de las rutas de administración parenteral, intravenosa, oral y tópica (incluyendo, así mismo, también, a la ruta oftálmica).

Se apreciará el hecho consistente en que, las personas expertas en el arte especializado de la técnica, seleccionarán, en base a sus propios conocimientos y experiencia, los apropiados componentes y forma galénica para objetivizar como diana el compuesto activo, a la piel o al pelo, teniendo en cuenta la ruta de administración la cual será la consistente en una forma por vía de inyección, en una aplicación tópica, en una administración intranasal, en una administración mediante sistemas implantados o transdérmicos de liberación sostenida, y por el estilo.

La sustancia objetiva, puede también formularse, así mismo, también, en un producto cosmético, tal como la consistente en las lociones, en las cremas, en los protectores o pantallas solares, en las cremas de aplicación después de tomar el sol (after-sun), en los bloqueantes de la radiación solar, y en las cremas y / o lociones antienviejimiento. Se apreciará el hecho de que, los presentes productos cosméticos, contendrán una mezcla de diferentes ingredientes los cuales son conocidos por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, que asegurarán una rápida penetración de la sustancia objetivizada como diana, al interior de la piel, y que prevendrán la degradación de éstos, durante el almacenaje de los mismos.

Se entenderá el hecho de que, el concepto de la presente invención, se aplicará, del mismo, modo, como una terapia adyuvante, la cual asista en los medicaciones utilizadas en el momento presente. Puesto que, los compuestos de la presente invención, pueden administrarse conjuntamente con materias alimenticias, pueden aplicarse productos alimenticios clínicos especiales, los cuales contengan una gran cantidad de las sustancias objetivizadas como diana. Resultará claro, el hecho consistente en que, mediante la lectura de la presente especificación de este documento de solicitud de patente, conjuntamente con las reivindicaciones anexas, las personas expertas en el arte especializado de la técnica, pretenderán una gran variedad de diferentes alternativas a las formas específicas de presentación, las cuales se mencionan aquí, en este documento de solicitud de patente.

En principio, los compuestos seleccionados de entre la hesperetina y la hesperetin-7-O-glucoronida en concordancia con la presente invención, pueden utilizarse para el tratamiento y / o la prevención de daños en la piel, los cuales se produzcan por una situación de estrés, tal como, por ejemplo, por mediación de un estrés biológico o físico, tal como, por ejemplo, mediante una exposición a los agentes oxidantes o los agentes carcinógenos, o la exposición a la radiación UV.

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, en este documento de solicitud de patente, las sustancias y / o las composiciones en concordancia presente invención, pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de daños en la piel, de una forma particular, los daños actínicos y del envejecimiento en la piel, tales como los consistentes en la sequedad, en la queratosis actínica, en la pigmentación irregular (comprendiendo, de una forma notable, a las pecas, a los lentigos, a las líneas superficiales, y a las arrugas profundas), en las pseudoescaras estelares, en la elastosis, en la inelasticidad, en las telangiectasias, en los lagos venosos, en la púrpura cutánea, en los comedones (espinillas o barros), en la hiperplasia sebácea, en los acrocordones, en los angiomas cereza, en la queratosis seborreica, en el lentigo, en carcinoma de células basales, en la quemaduras y / o formación de ampollas en la piel, en hiperplasia epidérmica, en la inflamación, en la supresión inmune, y en el cáncer, tal como, por ejemplo, los cánceres de la piel no melanomas y melanomas. Éstas tienen así mismo, también, unos beneficios particulares en el pelo y en el pelaje, beneficios éstos tales como los consistentes en una densidad incrementada del pelo o del pelaje, en el diámetro de las fibras, en el color, en la estructura grasienta, en la brillantez, en la producción de sebo, y en las ayudas para prevenir o evitar la pérdida de pelo o del pelaje.

El efecto de la suplementación alimenticia en los compuestos de flavononas o sus derivados, en concordancia con la presente invención, sobre la piel de los seres humanos o de los animales de compañía o domésticos, puede medirse, mediante la utilización de procedimientos convencionales, incluyendo al procedimiento de la eritematosa mínima (MED – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a minimal erythral dose] -), a la colorimetría, a la pérdida transdérmica de agua, a la reparación del DNA (tal como, por ejemplo, p.53), a la medición de las producción de interleucinas y de proteoglicanos, o la actividad colagenasa, la función de barrea, o la renovación de las células.

Los ejemplos los cuales se facilitan abajo, a continuación, ilustran la invención, en mayor detalle, sin restringir la misma a dichos ejemplos. Estos vienen precedidos por una descripción resumida de las figuras.

Fig. 1: Se procedió a incubar células HaCa T, con 10 μ M de esperetina (hp, barras rojas), ó 10 μ M de hesperetin-7-O-glucoronida (hp-7-O-gluc, barras amarillas), o cantidades iguales de DMSO, como control (barras azules), y se trataron con menadiona o sin ésta, durante un transcurso de tiempo adicional de 5 horas. Se procedió a analizar el sobrenadante, en cuanto a la actividad de éste para actividad lactato deshidrogenasa (LDH), y los resultados obtenidos, se expresaron con relación a las células las cuales se lisaron con tritron-X100, antes de proceder al análisis (100 % de mortalidad).

Fig. 2: Diagrama, el cual representa el ajuste del ensayo de crecimiento de la hesperidina.

Fig. 3: Análisis histopatológico de un la piel de la rata, suplementado con hesperidina. Se procedió a descerar secciones de 6 µm de parafina, éstas se marcaron, con una tinción de hematoxilina/eosina, y se montaron. Se muestran las imágenes representativas en dos magnificaciones, para el grupo de control (A y D), y los grupos suplementados con hesperidina (0,1 %: B y E, 0,5 % C y F).

Fig. 4: Análisis de PCR a tiempo real de RNA total, aislado de la piel de la rata, alimentada o bien con una dieta de control (ctrl), o bien con una dieta suplementada con hesperidina (0,1 % Hp, 0,5 % Hp), para la expresión de CD1d1, e interleucina 6 (IL-6). Las muestras, se analizaron en 3 grupos, los cuales contenían 4 ratas, cada uno de ellos, y se muestran los valores obtenidos de Ct, para CD1d1, en A, y para IL-6, en B. Los puntos, representan los valores medios de los triplicados técnicos, las barras, la media total por grupo. Los cambios incrementados, en la expresión relativa de la suplementación, en comparación con la dieta de control, relativa a un gen de limpieza, se muestran en C. La dieta de control, se ajustó a un valor de relación de 1, y éste, se encuentra representado mediante una línea gruesa. Los intervalos de confianza, se calcularon mediante un test de ensayo ANOVA.

Ejemplo 1: Agua mineral, suplementada con flavonona

Se procedió a preparar un agua mineral, mediante la adición de hesperetin-7-glucosa, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde los 0,01 mg hasta los 200 mg por litro, estimando el hecho de que, el consumo medio, es el correspondiente a aproximadamente 1 litro por día.

Ejemplo 2: Composición cosmética, para la administración oral

Una composición en forma de una cápsula dura, tiene la siguiente formulación

Compuesto	mg por cápsula
Hesperidina (equivalente de hesperetina)	250
Excipiente para el núcleo	
Celulosa microcristalina	70
Encompress™	60
Estearato magnésico	3
Sílice coloidal anhidro	1
Agente de recubrimiento	
Goma-laca	5
Talco	61
Sacarosa	250
Polividona	6
Dióxido de titanio	0,3
Agente colorante	5

La composición, puede administrarse al individuo, a razón de una cantidad de 2 ó 3 cápsulas diarias.

Ejemplo 3: producto alimenticio y suplementos enlatados, para animales de compañía

Se procede a preparar una mezcla compuesta por un porcentaje del 75 % de carcasas de aves de corral, de pulmones de cerdos y de hígado de ternera, un porcentaje del 16 % de harina de trigo, un porcentaje del 7 % de agua, un porcentaje del 2 % de colorantes, de saborizantes y aromatizantes, de vitaminas y de sales inorgánicas. Esta mezcla, se emulsiona, a una temperatura de 12 °C, y ésta se extrusiona, en la forma de un flan o pudding, el cual se cuece, a continuación, a una temperatura de 90 °C. Subsiguientemente, éste se enfría, a una temperatura 30 °C, y se corta en forma de porciones o pedazos. A continuación, se procede a mezclar un porcentaje del 45 % de las porciones o pedazos, con un porcentaje del 55 % de una salsa, preparada a partir de un porcentaje del 98 % de agua, un porcentaje del 1 % de colorantes, y un porcentaje del 1 % de goma de guar. A continuación, se procede a llenar latas de hojalata, con la mezcla anteriormente descrita, y éstas se esterilizan, a una temperatura de 125 °C, durante un transcurso de tiempo de 40 minutos.

Como un suplemento a ser mezclado con el producto alimenticio para animales de compañía o domésticos, antes de proceder a servirlo, se proporciona un envasado adicional, en forma de un saquito, con 50 mg de equivalente de hesperetina, en forma de un extracto de cítricos o agrios. Éste se suministra como un suplemento, unido la lata, de una forma susceptible de poderse volver a retirar, conjuntamente con instrucciones sobre la alimentación con el producto en cuestión.

Ejemplo 4: Producto alimenticio funcional

Se procedió a preparar un suplemento alimenticio, mediante el mezclado o batido de fructooligosacárido, con inulina, en las proporciones adecuadas, en peso, correspondientes a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde aprox. un 70 % de fructooligosacárido hasta aprox. un 30 % de inulina, y añadiendo 500 mg de equivalente de hesperetina. La mezcla prebiótica resultante, puede añadirse o mezclarse con cualquier portador o soporte el cual sea adecuado, tal como, por ejemplo, el consistente en un leche fermentada, en un yogurt, en un queso fresco, en una leche cuajada, en una barra de confitería o pastelería, en copos o barras de cereales para desayunos, en una bebida, en la leche en polvo, en un producto a base de soja, en un producto fermentado, no lácteo, o en un suplemento nutritivo para la nutrición clínica.

Ejemplo 5Material y procedimientos

Se procedió a incubar queratinocitos humanos, inmortalizados (HaCaT), con 10 μ M de hesperetina, 10 μ M de hesperetin-7-O-glucoronida, o cantidades iguales de DMSO, como un control negativo, durante un transcurso de tiempo de 16 horas, antes de proceder al reto propuesto. Se procedió, a continuación, a tratar las células, con 100 μ M de menadiona, un xenobiótico el cual genere especies de oxígeno reactivo, de una forma intracelular. Las células no tratadas con menadiona, se utilizaron como control positivo. Después de un transcurso de tiempo de 5 horas, se procedió a analizar el sobrenadante, en cuanto a la actividad lactato deshidrogenasa (LDH), como una medida para la mortalidad celular, mediante la utilización del test de ensayo de citotoxicidad, no radiactivo, CytoTox 96 (de la firma Promega, USA).

Muestras de piel

Se obtuvieron biopsias de la piel de ratas, del ensayo de crecimiento de hesperidina (Figura 2). Se procedió a extirpar piel dorsal, una parte, se fijó en 4 % PFA, y se embebió en parafina, una parte, se crioconservó, y otra parte, se congeló inmediatamente, en nitrógeno líquido.

Histología

Secciones de parafina

Se procedió a diseccionar la piel de rata, y ésta se fijó, durante un transcurso de tiempo de 4 días, en formaldehído en PBS, al 4 % (pH 7,4), a una temperatura de 4 °C, y se embebió en parafina, mediante la utilización de un aparato de embebido, del tipo Leica Microsysteme. A continuación, se procedió a lavar los tejidos en PBS y solución salina (0,9 NaCl), y éstos se deshidrataron, haciendo pasar los tejidos en cuestión, a través de soluciones salinas, con concentraciones incrementantes de etanol: durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, cada una de ellas, correspondientes a un porcentaje de concentración del 30 %, del 50 %, del 70 %, del 90 %, del 99 %, y durante hora adicional, a una concentración del 100 %. Subsiguientemente, las muestras de tejido, se incubaron, dos veces, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, en xileno, seguido de incubaciones de un transcurso de tiempo 2 – 3 horas, en cera de parafina, a una temperatura de 60 °C. A continuación, se procedió a cortar secciones de parafina, de 6 μ m de espesor, mediante la utilización de un aparato de tipo Leica Microtome. Después, las secciones, se descercaron, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, en xileno, y éstas se deshidrataron, haciéndolas pasar a través de una serie de soluciones de etanol, con concentraciones decrecientes de etanol: durante un transcurso de tiempo de 1 minuto, cada una, a unas concentraciones del 100 %, del 96 %, del 90 %, del 80 %, del 70 %, y del 50 %, de etanol. Finalmente, éstas se transfirieron a agua destilada, y se marcaron mediante tinción.

Tinción con hematoxilina / eosina

Se procedió a la tinción de las secciones rehidratadas, durante un transcurso de tiempo de 45 segundos, en una solución de hematoxilina de Mayer, y éstas se lavaron con la siguiente serie de soluciones, durante un transcurso de tiempo de 1 minuto, cada una: agua destilada, agua del grifo, agua destilada y etanol al 70%. Después de haber procedido a un marcaje por tinción, durante un transcurso de tiempo de 10 segundos, en una solución de eosina, (a una concentración del 1 %, referido a volumen / volumen), en etanol al 90 %), las secciones, se lavaron, en etanol al 90 % y el 100 %. Después de dos incubaciones de 10 minutos, en xileno, se procedió a montar cubreobjetos, con Eukit, y se secaron al aire, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a la temperatura ambiente.

Procedimientos mediante RNADirectrices generales para trabajar con RNA

Para llevar a cabo los experimentos con RNA, se procedió a la utilización de recipientes estériles, de plástico o de vidrio recocido (a una temperatura de 180 °C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 8 horas). La

totalidad de las superficies, se limpiaron con RNasa ZAP, previamente a proceder a su utilización, incluyendo pipetman, y se utilizaron únicamente los tipos resistentes a los aerosoles.

Equipo

- 5 Sistema de detección de secuencias, del tipo ABI PRISM® 7000HT Sequence Detection System, de procedencia de la firma Applied Biosystems, USA
 Sistema de software informático, del tipo ABI PRISM® 7000 RT-PCR software, de procedencia de la firma Applied Biosystems, USA
- 10 Temociclador de PCR, tal como, por ejemplo, un temociclador de PCR con controlador térmico programable, del tipo PTC-100 Programmable Thermal Controller, de procedencia de la firma MJ Research Inc., USA
 Bioanalizador del tipo Agilent 2100 bioanalyzer, de procedencia de la firma Agilent Technologies, USA
 Lector de placa fluorescente, por ejemplo, del tipo Spectra Fluor Plus F 129005, de procedencia de la firma Tecan, USA
- 15 Centrifuga del tipo Lector Multifuge 3S, Heraeus, provisto de cubetas especiales, para la centrifugación de MFC (células microbianas de combustible – [MFC, de su siglas, en idioma inglés, correspondientes a microbial fuel cell] -), de procedencia de la firma Kendro Laboratory Products, Switzerland
 Centrifuga de enfriamiento, tal como por ejemplo, del tipo Centrifuge 5417R, de procedencia de la firma Eppendorf, Alemania.

Reactivos

- Equipo de ensayo, a modo de “kit”, para procedimientos con RNA, del tipo Totally RNA Kit (Art. No. 1910), de procedencia de la firma Ambion, USA
- 25 Matriz de lisado, del tipo Lysing Matrix D (Art. No. 6913-100), de la firma Q BIOgene, Francia
 Ensayo de RNA del tipo RNA 6000 Nano Assay (Art. No.5065-4475 and 5065-4476), de procedencia de la firma Agilent Technologies, USA
 Ensayos sobre demanda, del tipo “Assays-on-demand” (20 x stock, de procedencia de la firma Applied Biosystems, USA)
- 30 RNasa ZAP (Art. No. 9780), de procedencia de la firma Ambion, USA
 Agua exenta de Nucleasa (ddH₂O, Art. No. 9939), de procedencia de la firma Ambion, USA
 Agua filtrada del tipo Milli-Q filtered water (0,22mM, ddH₂O)
 Etanol, GR para análisis (Art. No. 02860), de procedencia de la firma Fluka
 Solución salina tampona con fosfato de Dulbecco (PBS, Art. No. D 8537), de procedencia de la firma Sigma
- 35 β-Mercaptoetanol (Art. No. M7522), de procedencia de la firma Sigma, USA
 Equipo de ensayo de cuantificación de RNA, a modo de kit, del tipo RiboGreen RNA Quantitation Kit (Art. No. R-11490), de procedencia de la firma Molecular Probes, USA
 Inhibidor de RNasa, del tipo SUPERase-In RNase Inhibitor (20 U / ml, Art. No. 2694), de procedencia de la firma Ambion, USA
- 40 Transcriptasa inversa, con actividad RNasa H⁻ del tipo SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase (200U / ml, Art. No. 18064-014), de procedencia de la firma Invitrogen, USA
 Tampón de primera hebra del tipo First-strand buffer (5 x): 250 mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 0,1% (volumen / volumen) NP-40, 50% (v / v) glicerol, incluido con Transcriptasa inversa del tipo SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase
- 45 Ditiotreitól (DTT, 1 mM), incluido con Transcriptasa inversa con actividad RNasa H⁻ del tipo SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase
 2'-Deoxiadenosin-5'-trifosfato (dATP, 100 mM, Art. No. 272050), de procedencia de la firma Amersham Biosciences, Inglaterra
 2'-Desoxicidina-5'-trifosfato (dCTP, 100 mM, Art. No. 272060), de procedencia de la firma Amersham Biosciences, Inglaterra
- 50 2'-Desoxiguanosina-5'-trifosfato (dGTP, 100 mM, Art. No. 272070), de procedencia de la firma Amersham Biosciences, Inglaterra
 2'-Desoxitiidina-5'-trifosfato (dTTP, 100 mM, Art. No. 272080), de procedencia de la firma Amersham Biosciences, Inglaterra
- 55 Hexámero aleatorio del tipo pd(N)6 Random hexamer (Art. No. 27-2166-01), de procedencia de la firma Amersham Biosciences, Inglaterra
 Mezcla maestra universal de PCR, el tipo TaqMan Universal PCR Master Mix (Art. No. PN4304437), de procedencia de la firma Applied Biosystems, USA

60

Tabla 1. Ensayo sobre demanda utilizado (Ensayo ID), incluyendo los nombres de los genes, los símbolos de los genes, y las secuencias de referencia

Nombre del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia	Ensayo ID
Interleucina 6	I16	NM_012589	Rn00561420_m1
Antígeno CD1d1	Cd1d1	NM_017079	Rn_00567162_m1
Antígeno nuclear de células de proliferación	Pcna	NM_022381	Rn00574296_g1
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Gapd	NM_017008	Rn99999916_s1

Extracción de PCR

5 Se procedió a homogenizar muestras de piel, mediante la matriz de lisado del tipo Lysing Matrix D, y los RNAs totales, se extrajeron mediante la utilización del test de ensayo de RNA del tipo Totally RNA Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA, se extrajo con 40 µl de agua exenta de nucleasa.

10 Cuantificación de RNA

La cuantificación, se llevó a cabo mediante la utilización de un equipo de ensayo, a modo de kit, del tipo Ribogreen® RNA quantitation Kit, en placas de 96 pozos y un lector microplaca de fluorescencia, en concordancia con el manual. Las mediciones, se llevaron a cabo por duplicado. Las muestras, se diluyeron, bien ya sea a un factor de relación de 1 : 680, ó bien ya sea a 1 : 3.400, en un volumen final de 100 µl 1 x tampón TE. Se utilizaron, como patrones estándar, diluciones de RNA ribosómico, en una contracción correspondiente a unos valores de 1 µg / ml, de 0,5 µg / ml, de 0,1 µg / ml, de 0,02 µg / ml, y de 0 µg / ml, respectivamente. La integridad de 1 µl de RNA, se controló, mediante la utilización de un nano ensayo del tipo RNA 6000 Nano Assay.

20 Transcripción inversa

La totalidad de las manipulaciones efectuadas, se llevaron a cabo en hielo. Se procedió a añadir hexámeros aleatorios del tipo pd(N)6 Random hexamers, 1 µl de dNTP (10 mM), a 2 µg de RNA, en agua exenta de nucleasa, en un volumen final de 12 µl. Después de un transcurso de tiempo de 5 minutos, a una temperatura de 65 °C, se procedió a emplazar las muestras, de una forma inmediata, en hielo, y éstas se centrifugaron rápidamente. A continuación, se procedió a añadir 4 µl de 5 x tampón de primera hebra, 2 µl de ditioneitol, 1 µl de inhibidor de RNasa, y µl de transcriptasa inversa con actividad RNasa H⁻ del tipo SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase (volumen final, 20 µl). La reacción de transcriptasa inversa, se llevó a cabo en un termociclador de PCR, mediante la utilización del siguiente programa de temperaturas: 10 minutos, a una temperatura de 25 °C; reacción de transcripción inversa: 60 minutos, a una temperatura de 42 °C; inhibición de la enzima: 20 minutos, a una temperatura de 70 °C. Subsiguientemente, la muestra, se guardó en el congelador, a una temperatura de - 20 °C, hasta su uso.

35 Reacción en cadena de la polimerasa, a tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa, a tiempo real, se llevó a cabo en concordancia con el procedimiento TaqMan®, en placas de 96 pozos (96 WP), mediante la utilización de cebadores y de sondas, bajo demanda. El análisis, se llevó a cabo por triplicado, mediante la utilización de una mezcla maestra (3,5 x), la cual contenía 43,7 µl de TaqMan® mezcla maestra universal de PCR 2 x, 4,4 µl de cebadores y sondas de ensayos, bajo demanda, 21,9 µl de agua exenta de nucleasa, y 17,5 µl de cDNA (87,5 mg = 25 ng por replicado). Se procedió a cargar triplicados de 25 µl de mezcla maestra, en un placa de reacción, de 96 pozos, del tipo ABI PRISM reaction plate, éstos se cubrieron con una tapa de cobertura adhesiva ópticamente transparente, y se centrifugaron, tres veces, a una velocidad angular de 2000 r. p. m. (revoluciones por minuto), durante un transcurso de tiempo de 1 minutos, hasta que la totalidad de burbujas de aire, se hubieron eliminado. La reacción de PCR, se llevó a cabo en sistema de detección de secuencias, del tipo ABI PRISM® 700 Sequence Detection System, mediante la utilización del siguiente programa de temperaturas: activación de la enzima: 2 minutos, a una temperatura de 50 °C; desnaturalización: 10 minutos, a una temperatura de 95 °C, y 40 ciclos de amplificación objetivizada como diana: 15 segundos de reasociación, a una temperatura de 95 °C, y 1 minuto de extensión, a una temperatura de 60 °C. El análisis de los gráficos de amplificación, se llevó a cabo mediante la utilización de un sistema de software informático del tipo ABI PRISM® software, y los ajustes de la base de referencia, se realizaron de una forma individual (I16: 15 - 25, Cd1d1: 10 - 20, Pcna: 15 - 25; Gapd: 6 - 15), a cuyo efecto, los umbrales o límites, se ajustaron de una forma manual, a un valor de 0,2, para la totalidad de los cebadores. Los valores de Ct resultantes, se exportaron a un sistema informático de Microsoft Excel, para su análisis adicional.

Análisis estadístico

Los datos, se analizaron en un test de ensayo de análisis de varianza ANOVA.

5 Resultados y discusión

10 Los experimentos in vitro, los cuales se llevaron a cabo mediante la utilización de que queratinocitos inmortalizados (HaCat), demostraron el hecho de que, el tratamiento con hesperetina (hp), y hesperetin-7-O-glucuronida (hp-7-O-gluc), reducía la mortalidad celular, bajo unas condiciones normales de cultivo. El efecto protector de la hp y de la hp-7-O-gluc, era incluso más pronunciado en las células enfrentadas y expuestas a la menadiona, un xenobiótico, el cual incrementa los niveles de las especies de oxígeno reactivo (ROS). De una forma adicional, la hp-7-O-gluc, el metabolito de principal de la hesperidina en la sangre, parece ser más compacto, en comparación con la hp, la aglicona (Fig. 1).

15 Se procedió a investigar de una forma adicional, el efecto de la hesperidina, en un ensayo de intervención de un animal, mediante la utilización de ratas Wistar. Después del destete, las ratas, se distribuyeron de una forma aleatoria, en 3 grupos, con 12 animales cada uno de ellos, y se suplementaron con, bien ya sea una dieta de control, o bien ya con una dieta suplementada con hesperidina, mediante la utilización de dos dosis diferentes (0,1 % y 0,5 %). A la edad de 12 semanas, las ratas, se sacrificaron y, el tejido de la piel, se utilizó, para los análisis de histología y de mRNA (Fig. 2). El análisis histopatológico de la piel, reveló un reducido número de células inflamatorias los cuales se alimentaron con la dieta de esperidina. Las imágenes representativas, se muestran en la figura 3 (3 A + D) (control versus 3 B + E (0,1 % hesperidina) versus 3 C + F (hesperidina). Estas observaciones histológicas, pudieron confirmarse en el nivel de mRNA. Las ratas alimentadas con 0,5 % de hesperidina, mostraban unos niveles significativamente reducidos de IL-6, una citocina inflamatoria (Fig. 4 A + C). De una forma adicional, los niveles de CD1d1 mRNA, se encontraban significativamente disminuidos, en ambos grupos, suplementados con hisperidina (Fig. 4 B + C).

25 Estos datos, demuestran claramente las propiedades citoprotectoras y anti-inflamatorias de la hisperidina oralmente administrada para la piel.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Composición para la administración oral, la cual contiene, como ingrediente activo, por lo menos un compuesto de flavonona, el cual es la hesperidina, para su uso en la prevención y / o el tratamiento de las enfermedades de la piel.
- 2.- Composición para su uso según la reivindicación 1, en la cual, el compuesto de flavonona, se extrae de la pulpa o de la piel del cítrico, tal como el consistente en la naranja, el limón, la naranja amarga o el pomelo.
- 10 3.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, la cual contiene, de una forma adicional, otros compuestos activos, tales como los consistentes en la vitamina C, en la vitamina E, en los carotenoides, en las ubiquinonas, en las catequinas, en los extractos de café que contengan polifenoles y / o diterpenos, en los extractos de achicoria, en los extractos de ginkgo biloba, en los extractos de uva o de semilla de uva, en los extractos ricos en proantocianidinas, en los extractos de especias, en los extractos de soja, en otras fuentes de flavonoides con actividad antioxidante, en los ácidos grasos, en las fibras prebióticas, en los microorganismos probióticos, en la taurina, en el resveratrol, en los aminoácidos, en el selenio y en los precursores del glutatión.
- 15 4.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la cual consiste en la leche, en el yogurt, en la cuajada, en el queso, en los productos fermentados a base de leche, en las cremas heladas, en las materias en polvo a base de leche, en las fórmulas para niños pequeños o lactantes, en los productos a base de cereales, en los productos fermentados a base de cereales, en el agua mineral, en el chocolate, o en los productos alimenticios para animales domésticos o de compañía, en los suplementos dietéticos, en las tabletas.
- 20 5.- Uso oral, no terapéutico de por lo menos un compuesto de flavonona, el cual se trata de la hesperidina, para mejorar la hidratación, la firmeza o la elasticidad de la piel.
- 6.- Uso oral, no terapéutico de por lo menos un compuesto de flavonona, seleccionado de entre la hesperetina y la hesperedin-7-O-glucuronida, para reducir los signos del envejecimiento de la piel.
- 30 7.- Uso no terapéutico, según la reivindicación 6, para mejorar la hidratación, la firmeza o la elasticidad de la piel.
- 8.- Composición para la administración oral, la cual contiene, como agente activo, por lo menos un compuesto de flavonona, el cual se selecciona de entre la esperetina y la esperetin-7-O-flucuronida, para su uso para prevenir o evitar, aliviar o tratar los desórdenes o trastornos de la piel, o los daños producidos en ésta, mediante una situación de estrés, tal como la consistente en un estrés químico, biológico o físico, en una exposición a los oxidantes o a los carcinógenos, o en una exposición a la radiación UV.
- 35 9.- El uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, ó composición para sus uso según la reivindicación 8, en donde, el compuesto de flavonona, se extrae de la pulpa o de la piel de frutas cítricas, tales como las consistentes en la naranja, en el limón, en la naranja amarga, o en el pomelo.
- 40 10.- El uso, según una de las reivindicaciones 5 a 7, ó 9, ó composición para su uso según la reivindicación 8 ó 9, en donde, la composición, se trata de una composición nutritiva o farmacéutica.
- 45 11.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, 9 ó 10, ó composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde, la composición, contiene otros compuestos activos, tales como los consistentes en la vitamina C, en la vitamina E, en los carotenoides, en las ubiquinonas, en las catequinas, en los extractos de café que contengan polifenoles y / o diterpenos, en los extractos de achicoria, en los extractos de ginkgo biloba, en los extractos de semilla de uva, en los extractos ricos en proantocianidinas, en los extractos de especias, en los extractos de soja, en otras fuentes de flavonoides con actividad antioxidante, en los ácidos grasos, en las fibras prebióticas, en los microorganismos probióticos, en la taurina, en el resveratrol, en los aminoácidos, en el selenio y en los precursores del glutatión.
- 50 12.- Uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, 9 a 11, ó composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde, la composición, consiste en la leche, en el yogurt, en la cuajada, en el queso, en los productos fermentados a base de leche, en las cremas heladas, en las materias en polvo a base de leche, en las fórmulas para niños pequeños o lactantes, en los productos a base de cereales, en los productos fermentados a base de cereales, en el agua mineral, en el chocolate, o en los productos alimenticios para animales domésticos o de compañía, en los suplementos dietético, en las tabletas.
- 60

Fig. 1

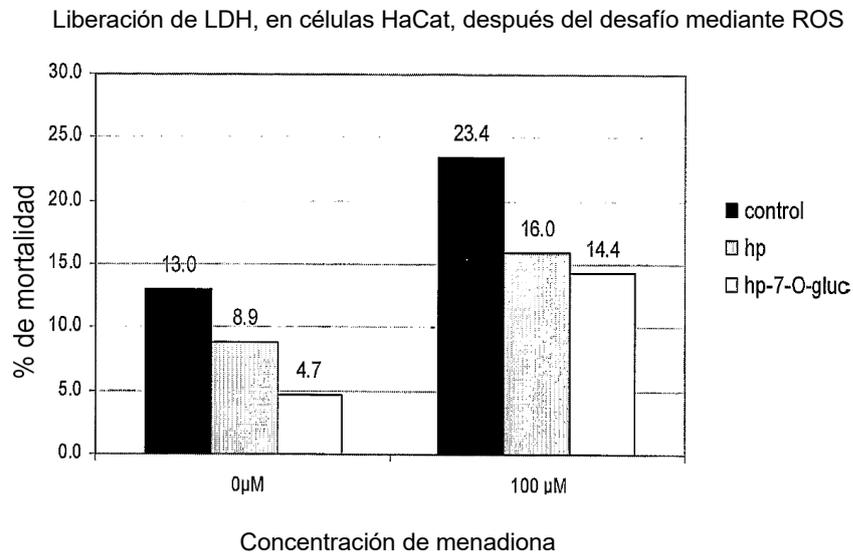
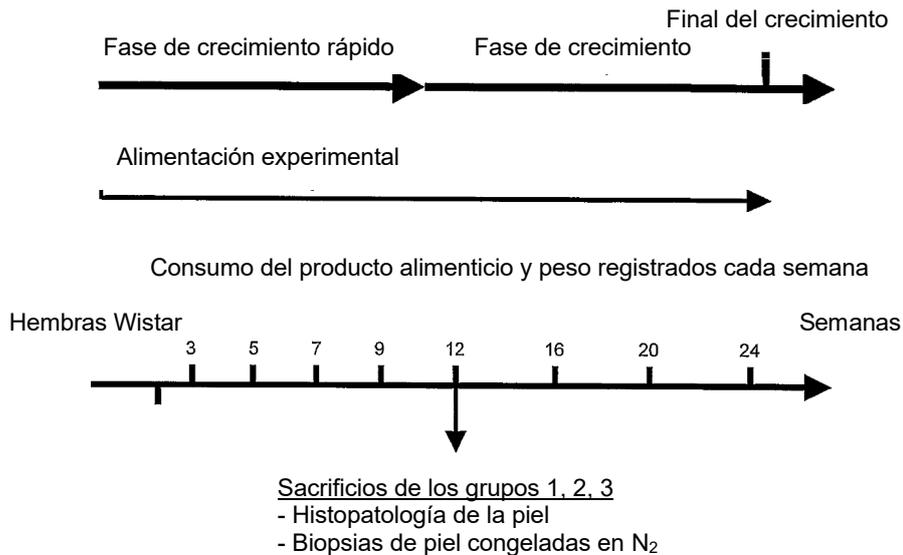


Fig. 2

Ensayo de crecimiento de la hesperidina AQ-04-01



- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> · (1) control del grupo sacrificado a las 12 semanas de edad · (2) grupo con dosis 1 (0,1 %) sacrificado a las 12 semanas de edad · (3) grupo con dosis 2 (0,5 %) sacrificado a las 12 semanas de edad |
|--|

Fig. 3

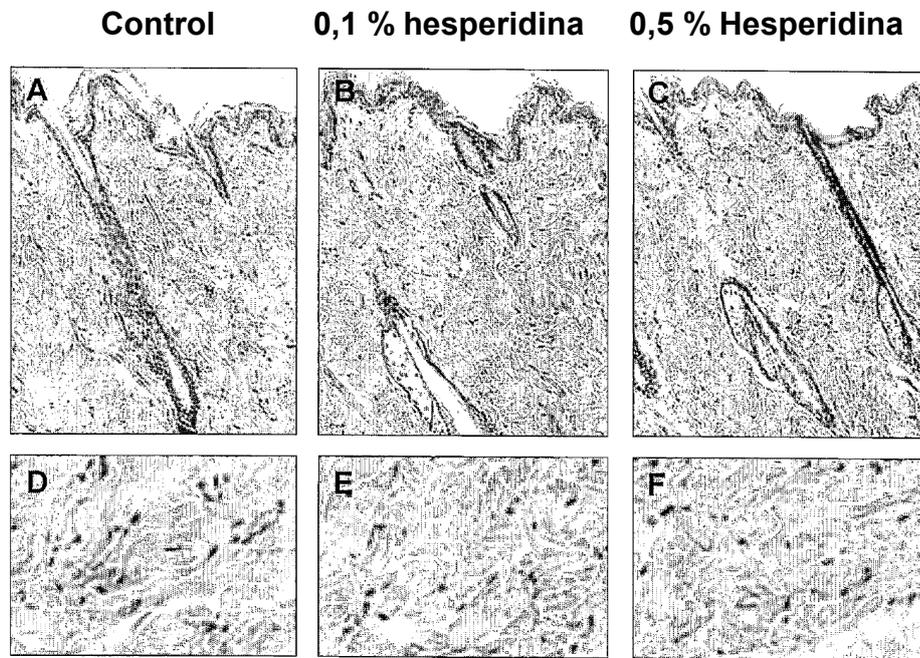


Fig. 4

