

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 251**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105 (2006.01)

A23L 33/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2010 PCT/EP2010/057431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010 WO10136570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10724392 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2434911**

54 Título: **Extractos de té verde de biodisponibilidad mejorada**

30 Prioridad:

29.05.2009 EP 09161493

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

10.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LAMBELET, PIERRE;
BORTLIK, KARLHEINZ;
SABATIER, MAGALIE;
CRESPY, VANESSA y
WILLIAMSON, GARY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 667 251 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

Extractos de té verde de biodisponibilidad mejorada

5 La presente invención se refiere a la utilización de una mezcla de proantocianidinas oligoméricas (OPC, por sus siglas en inglés) y ácido ascórbico para incrementar la biodisponibilidad de las catequinas EGCG y ECg del té verde. Se refiere además a un alimento, a un alimento para animales de compañía y a una composición cosmética que contiene la formulación de té verde estabilizada.

10 Antecedentes de la invención

El té verde, la bebida de consumo más común en todo el mundo después del agua, ofrece algunos importantes beneficios de salud. Los compuestos que se cree que son responsables de dichos beneficios son los polifenoles y en particular las catequinas.

15 Los polifenoles principales (flaván-3-ol) del té verde son las catequinas, es decir, la (+)-catequina (C) y su estereoisómero y cuatro derivados: (-)-epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) y (-)-epicatequina-3-galato (ECGg).

20 Aunque las cantidades de catequina varían según factores que influyen sobre el metabolismo vegetal, tales como la luz, las precipitaciones, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, la edad de la hoja y la constitución genética, habitualmente constituyen 20% a 30% de la materia seca de las hojas del té verde frescas. Las catequinas representan aproximadamente el 80% del contenido total de polifenoles del té verde. Debido a que raramente resultan destruidos durante la fabricación del té verde, las catequinas son una parte importante de los extractos comerciales del té verde.

25 Las catequinas del té verde muestran varios beneficios de salud que con frecuencia están asociados a sus actividades antioxidantes, incluyendo el secuestro de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo, la quelación de metales libres, la inhibición de factores transcripcionales y la inhibición de enzimas oxidativos tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa.

30 Los efectos de salud de los polifenoles dependen de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. Sin embargo, su biodisponibilidad es pobre, lo que aparentemente se relaciona con una inestabilidad particular de dicho compuesto bajo condiciones fisiológicas.

35 Una posible estrategia para incrementar la estabilidad de las catequinas del té verde bajo condiciones adversas es protegerlas con antioxidantes, evitando de esta manera los cambios químicos causados por la exposición al oxígeno. Por ejemplo, Rode et al. (2002) han demostrado que la incorporación de un antioxidante hidrosoluble (la vitamina C) estabiliza las catequinas del té verde en emulsiones aunque no se observa ningún efecto al utilizar antioxidantes lipofílicos tales como el hidroxitolueno butilado o el galato de propilo. En efecto, la totalidad de las cuatro especies de catequina y en particular EgC y EgCG, se ha encontrado que resultan estabilizadas en presencia de ácido ascórbico y que esta protección es dependiente de la dosis. Aunque dicho efecto protector del ácido ascórbico se ha conocido desde hace mucho tiempo, su efecto sobre la biodisponibilidad nunca ha sido confirmado.

45 El documento n° US2006/057230 propone un método para incrementar la biodisponibilidad del polifenol del té, mediante la administración de un polifenol del té por vía oral después de una noche de ayuno previa a la ingesta de polifenol del té. Sin embargo, no proporciona ninguna enseñanza sobre una solución que permite mejorar la biodisponibilidad del polifenol de té sin un periodo de ayuno. El complemento dietético PRO-C de Health Products Distributors INC comprende vitamina C, extracto de uva y extracto de té verde, entre otros ingredientes, para la utilización como antioxidante sin ninguna indicación sobre la biodisponibilidad de la catequina.

50 Zhen-Yu Chen et al. (1998) han demostrado que el ácido ascórbico permite mejorar la estabilidad de las catequinas del té verde en un pH específico de 7,42, que corresponde al pH intestinal antes de la absorción; dicho estudio especifica que estos resultados no son directamente trasladables a condiciones in vivo. Además, no se afirma nada sobre una potencial biodisponibilidad mejorada de las catequinas del té verde.

55 De hecho, en G. Williamson et al., Int. J. Vitam. Nutri Res. 77(3):224-235, 2007, recientemente se ha demostrado que la adición de antioxidantes (vitaminas y carotenoides) no presenta ningún efecto sobre la biodisponibilidad de polifenoles tales como catequinas.

60 De esta manera, es un objetivo de la presente invención solucionar los problemas anteriormente indicados mediante la provisión de una formulación que contiene catequinas con estabilidad mejorada y una biodisponibilidad incrementada. También es un objetivo de la presente invención proporcionar una formulación de té verde que presenta una biodisponibilidad incrementada que puede utilizarse para aplicaciones en productos alimentarios o de alimentos para animales de compañía, complementos nutricionales o alimentarios, o preparaciones cosméticas.

65

Descripción resumida de la invención

De acuerdo con lo anterior, es un primer objetivo de la invención proporcionar la utilización de una mezcla de procianidinas oligoméricas (OPC) y ácido ascórbico o análogos de la vitamina C para la preparación de un producto para incrementar la biodisponibilidad de las catequinas del té verde.

Ventajosamente, la composición presenta una estabilidad y biodisponibilidad mejoradas de su contenido de catequinas. Además, la composición presenta un valor nutricional mejorado, en forma de mejores biodisponibilidad y estabilidad. Puede utilizarse directamente o concentrado o seco en forma de polvos para varias aplicaciones en productos alimentarios de consumo diario o para otros usos nutricionales.

Es un objetivo adicional de la invención proporcionar un alimento, un alimento para animales de compañía, una preparación cosmética o un complemento nutricional, que contiene la formulación según la invención. La invención proporciona un método para incrementar la estabilidad y la biodisponibilidad de las catequinas del té verde utilizando una combinación de OPC y ácido ascórbico.

A continuación, la presente invención pone a disposición del consumidor una composición mejorada basada en catequinas del té verde que presentan una biodisponibilidad y bioeficacia incrementadas.

Figuras

La presente invención se describe además en lo sucesivo en la presente memoria en referencia a algunas de sus realizaciones mostradas en los dibujos adjuntos, en los que:

La fig. 1 muestra la estabilización de EGCg durante 5 h de incubación de té verde en presencia de concentraciones crecientes de vitamina C y OPC (Indena).

La figura 2 muestra la estabilización de EGCg durante 5 h de incubación de té verde en presencia de vitamina 0,2 mM y concentraciones crecientes de OPC.

Figura 3 - diseño del estudio clínico sobre administración de catequinas del té verde.

Figura 4: muestreo de sangre para farmacocinética del plasma para cada uno de los tratamientos A, B, C y D.

Descripción detallada de la invención

En la descripción a continuación, la expresión «catequinas del té verde» se entiende que se refiere a catequina (C), epicatequina (EC), galocatequina (GC), galato de galocatequina (GCG), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECg) y galato de epigalocatequina (EGCg).

Según el primer objetivo, se proporciona la utilización de una formulación que contiene catequinas, que comprende una mezcla de procianidinas oligoméricas (OPC) y ácido ascórbico para incrementar la biodisponibilidad de las catequinas del té verde.

De hecho, con el cribado de varias moléculas bajo condiciones fisiológicas, inesperadamente se ha encontrado que la adición de OPC y ácido ascórbico (vit. C) o análogos de la vit. C (tales como el furaneol, etc.) a una formulación que contiene catequinas mejora significativamente la biodisponibilidad de dichas catequinas. Las catequinas son del té verde.

El té verde puede utilizarse en forma de material fresco, concentrado o seco, por ejemplo material seco al aire o liofilizado. La cantidad de catequinas en la composición dependerá de la aplicación de dicha formulación. En una realización preferente, el contenido de catequinas, en particular en la forma de extracto de té verde, puede encontrarse comprendido entre 1% y 50%, y más preferentemente entre 5% y 30%.

Preferentemente, las OPC proceden de la uva. En una realización preferente, pueden obtenerse de corteza de pino o semillas de uva, por ejemplo. Alternativamente también podrían utilizarse extractos de cacao o de bayas silvestres como fuente de OPC, así como toda fuente conocida de OPC. Las procianidinas oligoméricas y el ácido ascórbico se añaden a las catequinas en una cantidad suficiente para como mínimo mejorar la biodisponibilidad de las catequinas. En una realización preferente, la composición contiene 1% a 80% de extracto de semillas de uva, preferentemente 10% a 40%, dependiendo de su contenido de OPC, que puede variar entre 60% y 99% de las OPC presentes en el extracto de semillas de uva. El ácido ascórbico o análogo de la vit. C puede encontrarse presente en una cantidad de entre 0,1% y 15%, más preferentemente de entre 1% y 6% (con respecto al extracto de té verde).

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición oral que comprende la formulación indicada anteriormente en un alimento, en un complemento alimentario, en un producto alimentario para animales de compañía o en una preparación cosmética. En una realización preferente, una composición alimentaria para el

consumo humano se complementa con la composición anteriormente indicada. Dicha composición puede ser una fórmula nutricionalmente completa, un producto lácteo, una bebida refrigerada o de larga conservación, una bebida en polvo, un agua mineral o purificada, una bebida líquida, una sopa, un complemento dietético, un sustituto de comida, una barra dietética, un producto de repostería, un producto lácteo o de leche fermentada, un yogur, una leche en polvo, un preparado para lactantes, un producto nutricional infantil, un producto de cereales o un producto a base de cereales fermentados, un helado, un chocolate, café, un producto culinario, tal como mayonesa, puré de tomate o aliño para ensaladas o un alimento para animales de compañía.

Para la ingestión, resultan posibles muchas realizaciones de composiciones orales y en particular de complementos alimentarios. Se formulan mediante los métodos habituales de producción de tabletas recubiertas de azúcar, píldoras, pastas, gomas, cápsulas de gelatina, geles, emulsiones, tabletas, cápsulas o soluciones o emulsiones bebibles, que seguidamente pueden ingerirse directamente con agua o mediante cualquier otro medio conocido.

Además, la formulación tal como se ha indicado anteriormente puede incorporarse en cualesquiera otras formas de complementos alimenticios o de alimentos enriquecidos, por ejemplo barritas dietéticas o polvos compactados o no compactados. Los métodos para la preparación de los mismos son generalmente conocidos.

La composición alimentaria o complemento alimenticio puede incluir además un edulcorante, un estabilizante, un antioxidante, un aditivo, un saborizante o un colorante. La composición puede contener además ingredientes bioactivos sintéticos o naturales, tales como aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, carotenoides, polifenoles, etc., que pueden añadirse mediante la mezcla en seco o en húmedo a dicha composición antes de la pasteurización y/o secado.

Según una realización, la composición de la invención puede utilizarse cosméticamente. La expresión «uso cosmético» se refiere a un uso no terapéutico que puede mejorar el aspecto o comodidad estética de la piel, pelaje y/o pelo de seres humanos o animales de compañía.

Al utilizarla cosméticamente, la composición o complemento alimentario de la invención puede adoptar cualquier forma de composición o complemento alimentario indicada anteriormente. Preferentemente, se encuentra en forma de complementos dietéticos, que pueden encontrarse en forma líquida o seca, tales como soluciones, sprays, tabletas, cápsulas, cápsulas de gelatina, pastillas, polvos, geles, emulsiones, etc. Más preferentemente, se encuentra en forma de una cápsula. Un complemento para el uso cosmético puede comprender adicionalmente un compuesto activo con respecto a la piel.

La cantidad de formulación o composición alimentaria o complemento alimentario que debe ser consumida por el individuo para obtener un efecto beneficioso dependerá también de su tamaño, tipo y edad.

Asimismo, la invención se refiere a un uso cosmético tópico de la formulación descrita anteriormente. Puede formularse en forma de lociones, champús, cremas, filtros solares, cremas para después del sol, cremas o pomadas antienvjecimiento, por ejemplo. Dicha composición que puede utilizarse tópicamente comprende adicionalmente una grasa o un aceite que puede utilizarse en cosmética, por ejemplo uno de los indicados en la obra de la CTFA, Cosmetic Ingredients Handbook, Washington. También resulta posible añadir otros ingredientes cosméticamente activos. La composición comprende adicionalmente un agente estructurador y un emulsionante. También pueden añadirse a la composición otros excipientes, colorantes, fragancias u opacificadores. Se apreciará que los presentes productos cosméticos contienen una mezcla de diferentes ingredientes conocidos por el experto en la materia, que garantizan una rápida penetración de dicha sustancia en la piel y evitan la degradación de los mismos durante el almacenamiento.

El producto de la presente invención puede utilizarse para incrementar la eficacia de las catequinas. Es conocido que las catequinas mejoran la salud de la piel, presentan efectos positivos en la prevención o tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, la diabetes de tipo 2, la función cognitiva o la inflamación. También pueden utilizarse para la reducción de peso. En consecuencia, la composición oral de la presente invención puede resultar útil en la prevención o tratamiento de pieles secas o para mejorar la densidad o firmeza de la piel.

El efecto de las composiciones según la presente invención sobre la piel de seres humanos o animales de compañía puede medirse mediante la utilización de métodos convencionales, incluyendo la dosis eritemática mínima (DEM), la colorimetría, la pérdida transepidermica de agua, la reparación del ADN, la medición de las interleuquinas y la producción de proteoglicanos o la actividad de colagenasa, la función de barrera o la renovación celular.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos no limitativos descritos a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estudio de estabilidad de las catequinas del té verde

Materiales y métodos

Se obtuvieron extractos comerciales del té verde (té verde instantáneo TCTG) de la fábrica de Choladi (Cherambadi, India). Se prepararon mediante extracción del agua a partir de la hoja verde a 90°C seguido del secado por pulverización. Se utilizaron dos lotes. Se muestran sus perfiles de catequinas en la Tabla I.

Tabla I. Contenido de catequinas de extractos de té verde de Choladi.

Lote	Cantidad [% de los polvos]					Total
	EgC	C	EgCg	EC	ECg	
1	7,4	0,3	7,8	2,3	1,1	18,9
2	10,6	0,4	13,3	2,6	1,7	28,6

Se recibieron diferentes calidades de OPC (procianidinas oligoméricas) de semillas de uva de Indena (Milan, Italia), Kikomann (Noda-City, Japón) para la serie de producto Gravinol y de DRT (Dax, Francia) para Vitaflavan 50. Las OPC de corteza de pino (Oligopin) se obtuvieron cortesía de DRT (Dax, Francia).

El furaneol (4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona), el homofuraneol (éter furaneolmetílico) y el norfuraneol se obtuvieron de Givaudan (Dübendorf, Suiza). La vitamina C, el maltol, la cisteína y el metabisulfito eran de Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza).

El estearoil-lactilato sódico (SSL, por sus siglas en inglés) y los ésteres del ácido diacetil-tartárico de monoglicéridos (Datem) eran de Danisco (Copenhague, Dinamarca).

El monohidrato de dihidrogenofosfato sódico y el dihidrato de hidrogenofosfato disódico eran de Merck (Darmstadt, Alemania).

Los estándares de las catequinas utilizados para la calibración de la HPLC se obtuvieron de Extrasynthèse (Genay, Francia).

Las muestras se prepararon siguiendo el método siguiente. Brevemente, se trató cada muestra con ácido acético (concentración final: 30%) durante 30 min y después se añadió a una solución acuosa que contenía acetonitrilo al 10%, EDTA 0,5 mg/ml y ácido ascórbico 0,5 mg/ml. A continuación, se centrifugó la mezcla durante 30 min a 14.000xg y se analizó el sobrenadante mediante HPLC. El seguimiento de dicho protocolo permite recuperar por completo todas las catequinas.

Se determinaron las catequinas del té verde mediante HPLC de fase inversa utilizando un método analítico basado en el método ISO FDIS 14502-2. El sistema de HPLC utilizado era un modelo 1100 series Hewlett-Packard (Geneva, Suiza) dotado de una matriz de fotodiodos de ultravioleta-visible y un detector fluorimétrico. Las catequinas se detectaron mediante absorción de UV a 280,4 nm excepto por las catequinas y la epicatequina que se detectaron mediante fluorescencia (excitación: 280 nm; emisión: 310 nm). Las muestras (10 µl) se separaron en una columna Zorbax RX - C18 (4,6 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, Agilent Technologies). La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando el gradiente indicado en la Tabla II. El caudal era de 1,0 ml/min.

Tabla II. Gradiente de solvente utilizado para la separación en HPLC de catequinas. Solvente A: agua que contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5%; solvente B: mezcla de MeOH y acetonitrilo (60:40) que contenía TFA al 0,05%.

Tiempo [min]	Solvente B [%]
0	10
10	11
32	27
32,1	50
35	50
35,1	10
45	10

Se calculó la concentración en la muestra de catequinas del té verde (C, EC, EgC, EgCg y ECg) basada en la curva de calibración correspondiente y se informó como % del valor inicial (muestra en t₀). Debido a que la cafeína, endógena de las muestras de té verde, es estable bajo las condiciones de ensayo seleccionadas, se utilizó como estándar interno para todos los cálculos. De esta manera, se utilizó la concentración observada en el extracto de té verde fresco para la normalización de los datos.

Se dispersó el té verde y antioxidantes o formulaciones correspondientes en tampón a pH 7,4 (Na-Pi, 100 mM) y se sometió a ensayo bajo condiciones estandarizadas (en recipientes abiertos, agitación constante a 37°C) durante

hasta 24 h. A intervalos de tiempo definidos, se recogieron alícuotas y se prepararon muestras para la inyección en la HPLC tal como se ha indicado anteriormente.

Resultados

5

Estabilización del extracto de té verde con vitamina C

10

Es conocido que la vitamina C es un potente antioxidante y que previene la degradación de las catequinas al añadirlo al té verde. Con el fin de tener una idea de la concentración mínima de vitamina C necesaria para conseguir la protección de las catequinas, se incubaron extractos de té verde que contenían cantidades crecientes de vitamina C durante hasta 24 h. Debido a que el objetivo del presente trabajo es conseguir la máxima protección de las catequinas bajo condiciones fisiológicas, se seleccionaron parámetros de incubación comparables a las condiciones que pueden observarse en el intestino, es decir, pH 7,4 a 37°C.

Tabla III: retención de catequinas dependiente de la dosis en muestras de té verde que contienen una concentración creciente de vitamina C incubadas durante hasta 24 h (C=catequina, EC=epicatequina, EgC=epigalocatequina, EgCg=epigalocatequín-3-galato, ECg=epicatequín-3-galato).

muestra	retención de catequinas						
	tiempo de incubación (h)	EgC	C	EgCg	EC	ECg	
GTE al 0,1% + vitamina C (mM)	(% del valor inicial)						
	control	2	0	104	1	89	77
	6	0	54	0	25	9	
	24	0	0	0	0	0	
0,1	2	0	106	3	90	81	
	6	0	53	0	26	9	
	24	0	0	0	0	0	
0,5	2	88	110	90	92	97	
	6	0	82	0	46	26	
	24	0	0	0	0	0	
1,0	2	92	108	94	93	97	
	6	20	126	41	83	87	
	24	0	0	0	1	0	
2,5	2	92	108	95	94	97	
	6	82	125	89	86	95	
	24	0	172	1	64	53	
5,0	2	93	107	94	93	97	
	6	85	117	88	86	91	
	24	62	175	69	75	78	

15

20

25

Tal como ya se conoce a partir de investigaciones anteriores, EgC y EgCg son las catequinas más inestables y ya se han degradado en su mayor parte tras 2 h de incubación en el extracto de té verde no protegido (Tabla III). Con la concentración seleccionada, eran visibles efectos significativos de la vitamina C sólo a la concentración de 0,5 mM aunque otros experimentos han demostrado que el ácido ascórbico a una concentración de 0,2 mM ya ejerce una cierta protección por lo menos durante 2 h de incubación (datos no mostrados). La máxima protección a las 2 h se obtiene con una concentración de vitamina C igual o superior a 1 mM, mientras que la meseta ya se alcanza a 2,5 mM a lo largo de un periodo de estabilización de 6 h. Las otras catequinas son más estables bajo las condiciones seleccionadas y tras 6 h parte de ellas todavía podían detectarse en la muestra libre de vitamina C.

La adición de ácido ascórbico a los ensayos también mejora significativamente su estabilidad de una manera dependiente de la dosis. Notablemente, en el té verde estabilizado con vitamina C (>1 mM), la cantidad de catequinas (C) se incrementó constantemente durante la incubación, alcanzando 175% del valor inicial tras 24 h.

Esta generación dependiente del tiempo de C no se investigó en detalle aunque es bien conocido que algunas catequinas presentan una tendencia a la epimerización. La epimerización continua de otra especie de catequina en C y una degradación retardada de C por las concentraciones crecientes de ácido ascórbico podría ser una explicación del incremento de C con el tiempo.

5 Se encontró que la vitamina C era un antioxidante eficiente para la protección de las catequinas. Suponiendo que la absorción intestinal se completa tras 2 a 3 h, una concentración >0,2 mM resulta suficiente para ya conseguir una protección máxima.

10 Efecto sobre la estabilización de las catequinas del té verde de las procianidinas oligoméricas (OPC) + vitamina C

15 Los extractos ricos en OPC se caracterizan por su contenido oligomérico o polimérico de catequinas y la actividad antioxidante atribuida a dichos compuestos. Sin embargo, todavía existen cantidades considerables de monómeros presentes en estas preparaciones dependiendo de la materia prima y procedimiento utilizados para la extracción. En efecto, los extractos ricos en OPC es conocido que contienen por lo menos catequina y epicatequina, dos especies de catequina que también se encuentran presentes en los extractos de té verde. Debido a que la adición de estos extractos al té verde podría modificar significativamente el perfil de las catequinas en la mezcla, se llevó a cabo una caracterización de los extractos de OPC seleccionados para su perfil de monómero de catequina.

20 Los resultados analíticos confirmaron que C y EC eran las especies de catequina prevalentes presentes en las preparaciones de OPC en cantidades variables entre 1% y 20% (p/p) de la muestra total (Tabla IV). No se encontró EgC en los extractos. Además, se observaron cantidades pequeñas de EgCg en las OPC de semilla de uva de Indena y en las OPC de corteza de pino Oligopin. Se observó ECg en ambos extractos y en la muestra de Vitaflavan. La totalidad de dichas tres muestras era particularmente rica en monómeros de catequina.

25 Tabla IV: perfil de monómeros de las catequinas en preparaciones comerciales ricas en OPC. (C = catequina, EC = epicatequina, EgC = epigalocatequina, EgCg = epigalocatequín-3-galato, ECg = epicatequín-3-galato).

Productos ricos en OPC	contenido de catequinas y de cafeína						
	(g / 100 g de muestra)						
	EgC	C	cafeína	EgCg	EC	ECg	Tot.
Oligopin	0,0	4,3	0,0	0,1	0,8	0,3	5,4
Vitaflavan 50	0,0	18,3	0,0	0,0	11,3	0,9	30,5
Gravinol	0,0	0,8	0,0	0,0	0,4	0,0	1,3
Gravinol- T	0,0	0,5	0,0	0,0	0,3	0,0	0,8
Gravinol - S	0,0	2,7	0,0	0,0	1,0	0,0	3,8
Gravinol - SL	0,0	2,4	0,0	0,0	1,2	0,0	3,6
Indena	0,0	16,0	0,03	0,2	11,7	1,5	29,5

30 A continuación, se midió el efecto sobre la estabilidad de las catequinas del té verde para diferentes mezclas de OPC/vitamina C. Se ha demostrado (Tabla V) que en comparación con la protección de la vitamina C por sí sola, la mayoría de combinaciones con extractos de OPC mostró una mejor retención de EgC y EgCg tras 2 y 5 h.

35 El preparado de OPC de Indena se conservó para ensayos de optimización adicionales.

Tabla V: protección de catequinas en muestras incubadas de té verde estabilizadas por vitamina C y extractos ricos en OPC de diferentes proveedores (C=catequina, EC=epicatequina, EgC=epigalocatequina, EgCg=epigalocatequín-3-galato, ECg=epicatequín-3-galato)

muestra	retención de catequinas					
	tiempo de incub. (h)	EgC	C	EgCg	EC	ECg
OPC al 0,5% + vitamina C 0,2 mM		en % del valor inicial				
control (solo vit. C)	2	61	100	75	92	97
Oligopin	2	97	93	86	79	95
Vitaflavan 50 *	2	91	97	89	95	98
Gravinol	2	63	94	77	94	91
Gravinol - T	2	33	95	54	93	94
Gravinol - S	2	70	96	83	102	98
Gravinol - SL	2	67	92	78	91	93
Indena *	2	99	103	85	100	101
control (solo vit. C)	5	7	104	14	82	83
Oligopin	5	41	84	60	73	87
Vitaflavan 50 *	5	63	87	66	85	89
Gravinol	5	22	85	34	79	83
Gravinol - T	5	2	79	9	73	74
Gravinol - S	5	19	83	44	86	85
Gravinol - SL	5	31	82	47	80	82
Indena *	5	73	98	64	94	94

* integración difícil debido a la elevada conc. de monómeros de catequina en muestras de OPC

Respuesta a la dosis de OPC + vitamina C sobre la estabilidad de las catequinas

5 Con el fin de optimizar las proporciones de vitamina C a OPC para la protección de las catequinas, se incubó té verde que contenía tres concentraciones diferentes de vitamina C (0,1 mM, 0,2 mM y 0,3 mM) con cantidades crecientes de OPC durante hasta 5 h. Debido a su fuerte inestabilidad, se seleccionó EgCg como compuesto marcador para evaluar la eficiencia de la protección. Tal como se ha observado anteriormente, la adición de OPC a las muestras incubadas incrementó significativamente la estabilidad de EgCg en comparación con el control con solo vitamina C (figura 1). El efecto protector de las OPC era claramente dependiente de la dosis y se incrementó continuamente con el incremento de la concentración inicial de vitamina C. Sin embargo, el incremento no era lineal: una dosis 5 veces más alta de OPC no provocó una protección 5 veces más alta. El efecto de la adición de OPC era más pronunciado a la concentración de vitamina C más baja, aunque en este caso la protección global también era más baja, resultando únicamente en una retención de EgCg de aproximadamente 50%.

15 Para reducir al máximo el impacto de las catequinas de semillas de uva sobre el perfil global de catequinas, se llevó a cabo un ensayo de estabilidad con la adición de OPC en el intervalo de entre 0,025% y 0,1% junto con vitamina C 0,2 mM. Tras una incubación de 5 h, se observó que la protección de EgCg en el té verde era dependiente de la dosis y alcanzó un máximo de 40% a 0,1% de OPC (figura 2). El incremento observado no era lineal; en particular a una concentración de OPC de 0,05%, la protección de EgCg ya correspondía a 75% de lo observado con 0,1% de OPC. Finalmente, se seleccionó dicha formulación, que combinaba vitamina C 0,2 mM con 0,05% de OPC, como buen compromiso entre la protección global de las catequinas y un contenido reducido de OPC. Se sometió a ensayo clínico para evaluar el efecto de VitC/OPC en la mejora de la biodisponibilidad de las catequinas.

25 Ejemplo 2: Estudio de biodisponibilidad

Materiales y métodos

Sujetos

Se incluyeron en el ensayo doce hombres de edades comprendidas entre 22 y 46 años, procedentes del NRC. Los voluntarios se declararon sanos tras completar un cuestionario médico y fueron examinados por un médico. Durante el estudio no se permitió ninguna medicación ni complementos de vitaminas-minerales. Todos los sujetos eran no fumadores. Las personas vegetarianas, veganas y hombres con un consumo habitual de más de 3 tazas de té (de todo tipo, incluyendo el té de hierbas) por semana o 200 g de chocolate a la semana, incluyendo productos que contienen chocolate, fueron excluidos del estudio. Los sujetos fueron completamente informados de los objetivos del estudio y proporcionaron su consentimiento informado por escrito. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético del CHUV de Lausanne.

Diseño del estudio

En la figura 3 se muestra un diagrama esquemático del estudio. El presente estudio presentaba un diseño cruzado de doble ciego. El producto sometido a ensayo era un extracto de té verde, TCTG (CWS.08), un extracto acuoso de hojas de té verde producido en Choladi (Nestlé India) y suministrado por Givaudan. Dicho extracto de té verde se utilizó para cuatro tratamientos diferentes en el estudio. Comprendían:

- Polvos de extracto de té verde (GT) (1 g por persona)
- Polvos de extracto de té verde con extracto de semilla de uva y vitamina C (GTCV) (1,535 g de producto por persona que contenía 1 g de extracto de té verde, 0,5 g de extracto de semilla de uva y 0,035 g de vitamina C).
- Polvos de extracto de té verde con dos otras formulaciones que no se describirán adicionalmente en la presente memoria.

Los cuatro productos estudiados se etiquetaron con los códigos de producto A, B, C y D. Los cuatro tratamientos diferentes se encapsularon en cápsulas de gelatina y se administraron por vía oral con 300 ml de agua de baja mineralización 2 h antes del desayuno. Se proporcionó a los sujetos 1 g de extracto de té verde por tratamiento. La composición de catequinas del extracto se proporciona en la Tabla 6.

Tabla 6: perfil de catequinas del extracto de té verde ref. 52160450BA (%).

EGC	Cat	EGCG	EC	ECG	Total
12,4	0,4	17,8	2,2	3,1	35,9

Dos días antes de recibir un tratamiento, se pidió a los sujetos que no consumiesen alcohol, alimentos y bebidas ricos en flavonoides, productos de té, té de hierbas, productos de chocolate, productos de café, zumo de uva ni más de 250 ml al día de otros zumos de fruta. Se estandarizó su dieta un día antes y el día del experimento. Ese día los sujetos llegaron en ayunas a la Unidad Metabólica, en donde consumieron un desayuno ligero libre de catequinas. Se colocó un catéter en el brazo derecho o izquierdo para permitir extracciones repetidas de sangre en los intervalos indicados posteriormente durante 8 horas. Dos horas después del desayuno los sujetos recibieron uno de los 4 tratamientos: A, B, C o D, según asignación aleatoria. Se extrajeron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 y 480 min después de la absorción del tratamiento. Se infundieron 250 ml de suero fisiológico (NaCl al 0,9%) por el catéter durante 6 horas con el fin de evitar la obstrucción del mismo. Antes del muestreo de sangre, se extrajeron 2 ml de líquido por el catéter para evitar la contaminación de las muestras de sangre por NaCl. Los sujetos recibieron la comida del mediodía en la Unidad Metabólica. Se proporcionó una comida estandarizada para la cena. Por la mañana, el día después se extrajo una muestra de sangre en ayunas para completar la farmacocinética.

TRATAMIENTOS DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS

Cada muestra de sangre se centrifugó a 3.500 g a 4°C durante 10 min inmediatamente después de extraer la sangre para la obtención del plasma. El plasma obtenido de dicho tubo se mezcló con EDTA y vitamina C. A continuación, se congelaron las muestras a -80°C hasta el análisis. El análisis se llevó a cabo en un laboratorio externo (Brunswick Laboratories, LLC, Norton, MA, USA) siguiendo el protocolo siguiente. Brevemente, se centrifugó el plasma descongelado (14.000 rpm, 5 min, 4°C) en una centrífuga Eppendorf 5417R. A continuación, se mezclaron 200 µl de plasma con 12 µl de ácido ascórbico al 10%-KH₂PO₄ 40 mM-EDTA al 0,1%, 20 µl de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,4), 20 µl de galato de catequina (CG) 1,0 µg/ml como estándar interno, 500 unidades de β-d-glucuronidasa tipo X-A de *E. coli* (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) y 4 unidades de sulfatasa tipo VIII de vísceras de Abalone (Sigma Chemical Co). La mezcla se incubó a 37°C durante 45 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 ml de acetato de etilo, seguido de la agitación vigorosa durante 20 min y la centrifugación a 4°C a 2.000 X g durante 5 min. se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se repitió la extracción con acetato de etilo. Se añadieron 10 µl de ácido ascórbico al 0,02%: EDTA al 0,005% a la fracción de sobrenadante agrupada y se agitó con vórtex vigorosamente para la mezcla. A continuación, se evaporó el sobrenadante a sequedad con nitrógeno durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras se reconstituyeron en 200 µl de metanol: agua (1:2 vol.), se agitaron con vórtex bien, se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron (14.000 rpm, 5 min, 4°C). Se inyectaron 20 µl del sobrenadante

en el sistema de HPLC. La HPLC-sistema de detección electroquímica (ECD, por sus siglas en inglés) consistía en un sistema de administración de solvente ESA modelo 582, automuestreador ESA modelo 542, detector electroquímico ESA 5600 CoulArray (ESA, Bedford, MA, USA) con software CoulArrayWin 1.12, calentador de columna Eppendorf CH-30, una columna de guarda C18 Phenomenex, de 4,0 mm L x 3,0 mm y una columna SUPELCO Ascentis RP-Amida, 15 cm X 4,6 mm de d.i., partículas de 5 µm. Se prepararon soluciones de flavanol estándares y estándar interno (galato de catequina) en una solución de metanol y agua (1:2 vol.) y se almacenaron a -70°C. La columna se eluyó a 35°C partiendo de un caudal de 1 ml/min con 70% de tampón A (fosfato amónico monobásico 40 mM, pH ajustado a 3,0 con ácido fosfórico) y 30% de tampón B (fosfato amónico monobásico 40 mM 50%/L: 50% acetonitrilo/l, pH ajustado a 3,0 con ácido fosfórico). Tras un min, el gradiente se modificó linealmente de 70% de tampón A y 30% de tampón B a 10% de tampón A y 90% de tampón B (1-10 min), 70% de A/30% de B (10-12). Se realizó un seguimiento del eluyente mediante HPLC-detección electroquímica con ajustes de potencial a -30, 100, 230, 400 mV. El canal dominante se encontraba en 230 mV.

Resultados:

Biodisponibilidad en plasma de epigallocatequín-3-galato

Para el epigallocatequín-3-galato (EGCG), el límite de cuantificación era 0,005 µg/ml. Los parámetros cinéticos de epigallocatequín-3-galato de diferentes tratamientos se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7: parámetros cinéticos de epigallocatequín-3-galato según tratamiento (media ± sd).

Tratamiento	Número de sujeto	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (min)	AUC _(0-22h) (µg/ml*min)
[GTVC]	12	0,206 ± 0,053	108 ± 30	51 ± 15
[GT]	12	0,171 ± 0,079	103 ± 20	40 ± 12
Diferencia relativa		+ 20,5%		+ 27,5%

La adición de extracto de semilla de uva y vitamina C al extracto de té verde incrementó la AUC y la C_{max} de EGCG en 27,5% y 20,5%, respectivamente. La T_{max} no resultó afectada por la mezcla.

En el caso de que AUC(22h - inf.) sea inferior a 30% de AUC(0h - inf), puede considerarse AUC(0h - inf) y T_{1/2}. La AUC(0h - inf) y T_{1/2} del epigallocatequín-3-galato de diferentes tratamientos se proporcionan en la Tabla 8.

Tabla 8: AUC_(0h - inf) y T_{1/2} del epigallocatequín-3-galato según tratamiento (media ± sd).

Tratamiento	Número de sujeto	AUC _(0h - inf) (µg/ml*min)	T _{1/2} (min)
[GTVC]	12	58 ± 15	292 ± 134
[GT]	10	46 ± 17	241 ± 174
Diferencia relativa		+ 26%	+21%

La AUC media de dichas curvas cinéticas extrapoladas de epigallocatequín-3-galato se incrementó en 26% al mezclar el té verde con el extracto de semilla de uva y la vitamina C en comparación con el extracto de té verde (GT) consumido solo. La T_{1/2} también se incrementó en 21%.

Biodisponibilidad en plasma de epigallocatequín-3-galato

Para el epicatequín-3-galato, el límite de cuantificación era 0,005 µg/ml. Los parámetros cinéticos del epigallocatequín-3-galato de diferentes tratamientos se proporcionan en la Tabla 9.

Tabla 9: parámetros cinéticos del epigallocatequín-3-galato según tratamiento (media ± sd).

Tratamiento	Número de sujeto	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (min)	AUC _(0-22h) (µg/ml*min)
[GTVC]	12	0,15 ± 0,10	153 ± 83	114 ± 106
[GT]	11 ^b	0,11 ± 0,08	104 ± 39	80 ± 79
Diferencia relativa		+ 26%	+ 47%	+ 42,5%
En [GT] de los tratamientos, faltan los datos de t sujetos "16" ^{bn} .				

La coingestión de extracto de semilla de uva y vitamina C con el extracto de té verde incrementó la AUC, la C_{max} y la T_{max} de ECg en 42,5%, 26% y 47%, respectivamente. En el caso de que AUC(22h - inf.) sea inferior a 30% de AUC(0h - inf), puede considerarse AUC(0h - inf) y T_{1/2}. La mayoría de los sujetos presentaba AUC(22h - inf.) > 30% de AUC(0h - inf). Por lo tanto, no puede llevarse a cabo la extrapolación.

Biodisponibilidad en plasma de epigallocatequina

Para la epigallocatequina, el límite de cuantificación era de 0,005 µg/ml.

Los parámetros cinéticos de la epigalocatequina de diferentes tratamientos se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 10: parámetros cinéticos de epigalocatequina según tratamiento (media ± sd).

Tratamiento	Número de sujeto	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (min)	AUC _(0-22h) (µg/ml*min)
[GTVC]	12	0,96 ± 0,65	120 ± 46	238 ± 129
[GT]	11 ^b	0,81 ± 0,45	125 ± 58	229 ± 151
Diferencia relativa		+ 18,5%		+ 3,9%
En [GT] de los tratamientos, faltan los datos de los sujetos "04 ^{bn} ", "0" y "14 ^{cn} ".				

5 La coingestión de extracto de semilla de uva y vitamina C con el extracto de té verde incrementó la AUC y la C_{max} de EGC en 3,9% y 18,5%, respectivamente. La T_{max} no resultó afectada por la mezcla.

10 En el caso de que AUC(22h - inf.) sea inferior a 30% de AUC(0h - inf), puede considerarse AUC(0h - inf) y T_{1/2}. La AUC(0h - inf) y la T_{1/2} de la epigalocatequina de diferentes tratamientos se proporcionan en la Tabla 11.

Tabla 11: AUC_(0h - inf) y T_{1/2} de la epigalocatequina según tratamiento (media ± sd).

Tratamiento	Número de sujeto	AUC _(0h - inf) (µg/ml*min)	T _{1/2} (min)
[GTVC]	12	252 ± 136	211 ± 1123
[GT]	11	257 ± 153	259 ± 145

15 Los parámetros cinéticos no se incrementaron al extrapolar la AUC.

Biodisponibilidad en plasma de la epicatequina y la catequina

20 La comparación para la epicatequina y la catequina no resultó posible ya que el extracto de semilla de uva contenía 24,3% de las catequinas totales y epicatequina.

Conclusión:

25 Se ha demostrado que la biodisponibilidad de la catequina principal (EGCg) del extracto de té verde es mayor al coingerirla con una mezcla de vitamina C y extracto de semilla de uva. Se realizó la misma observación para ECg.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización no terapéutica de una composición que comprende una mezcla de procianidinas oligoméricas (OPC) y ácido ascórbico o análogos de vitamina C con por lo menos una catequina del té verde para la mejora de la biodisponibilidad de las catequinas EGCg y ECG del té verde.
- 10 2. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es un producto alimentario, un producto alimentario para animales de compañía, una composición nutricional, un nutraceutico, un complemento alimenticio y una composición cosmética.
- 15 3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el producto alimentario se selecciona de entre el grupo que consiste en un preparado nutricionalmente completo, un producto lácteo, una bebida refrigerada o de larga conservación, una bebida en polvo, un agua mineral o purificada, una bebida líquida, una sopa, un complemento dietético, un sustituto de comida, una barrita dietética, un producto de repostería, un producto lácteo o de leche fermentada, un yogur, una leche en polvo, un preparado para lactantes, un producto nutricional infantil, un producto de cereales o un producto a base de cereales fermentados, un helado, un chocolate, café o un producto culinario.
- 20 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el complemento alimentario se proporciona en forma de cápsulas, cápsulas de gelatina, cápsulas blandas, tabletas, tabletas recubiertas con azúcar, píldoras, pastas o pastillas, gomas, soluciones o emulsiones bebibles, jarabes o geles.
- 25 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además por lo menos uno de entre un edulcorante, un estabilizador, un saborizante y un colorante.
6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la prevención o tratamiento de pieles secas o para la mejora de la densidad o firmeza de la piel.

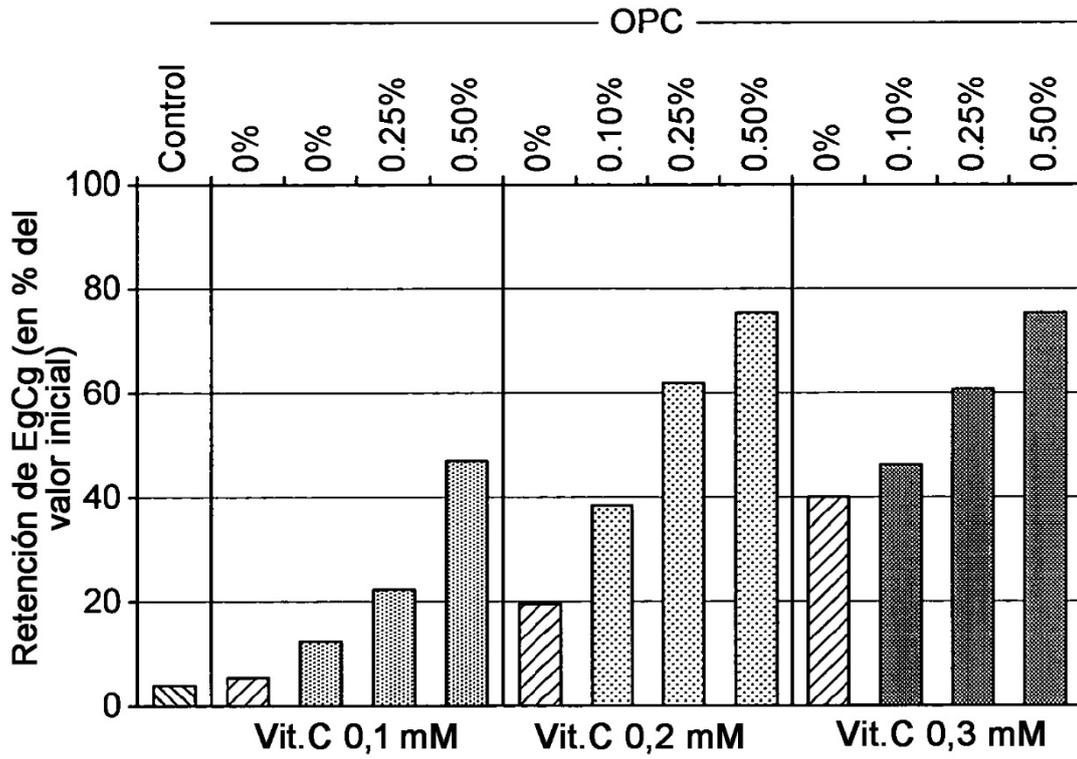


FIG. 1

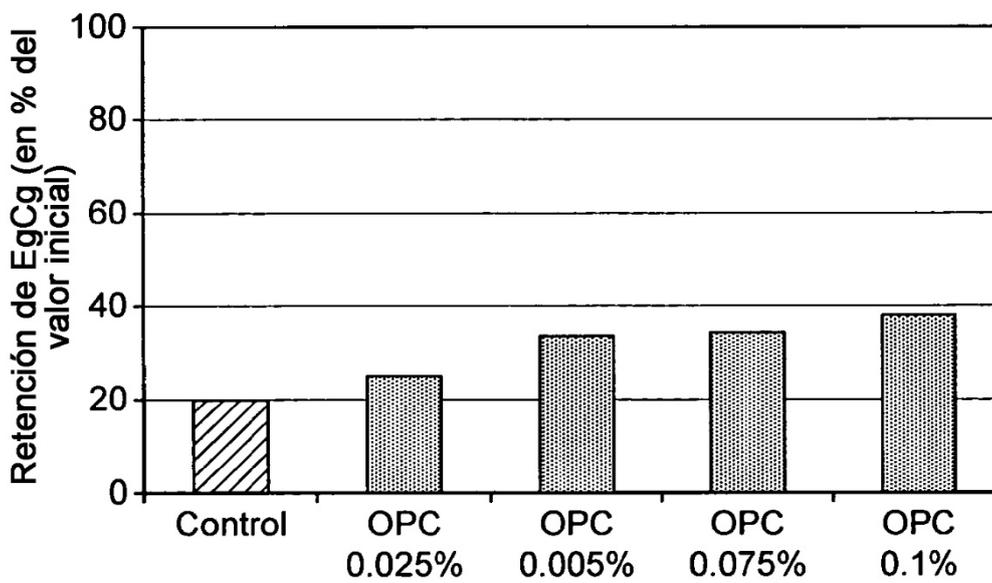


FIG. 2

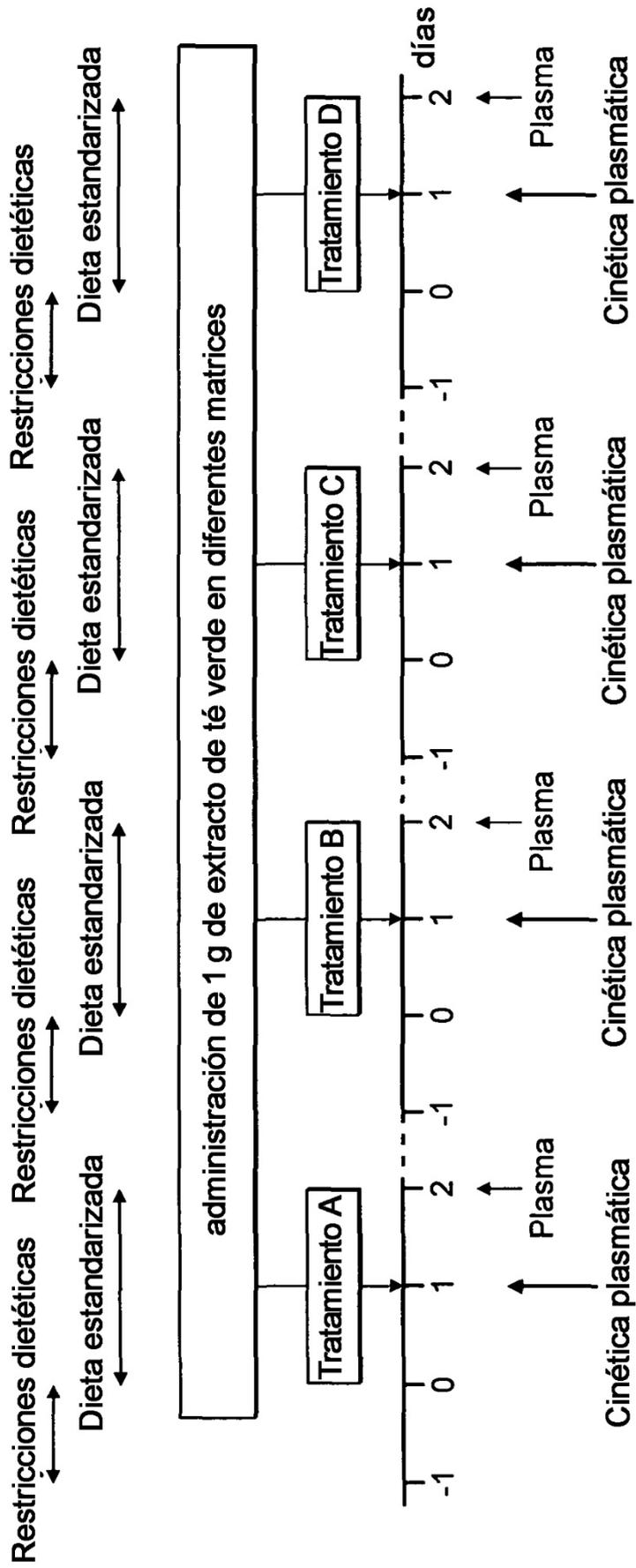


FIG. 3

