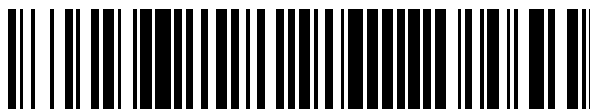


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 247**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7028 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

A23L 2/52 (2006.01)

A23L 33/105 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2013** **PCT/JP2013/050767**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013** **WO13108822**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2013** **E 13738502 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 2805722**

54 Título: **Extracto de olivo que contiene desramnosilacteósido**

30 Prioridad:

19.01.2012 JP 2012009399

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

21.11.2019

73 Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40 Dojimahama 2-chome Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:

FUKUI, YUKO;
ONO, YOSHIKO;
MAEDA, MITSURU y
TOMIMORI, NAMINO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 732 247 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto de olivo que contiene desramnosilacteósido

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a extractos de olivo que comprenden desramnosil acteósido (denomino a partir de ahora en el presente documento como "DRA"), y métodos para preparar el mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a extractos de olivo que comprenden DRA y que tienen actividad antioxidante de la sangre, y métodos para preparar los mismos.

Técnica anterior

El olivo (*Olea europaea*) es una planta que pertenece al género *Olea* de la familia *Oleaceae* y se cultiva en amplias zonas geográficas incluida la región mediterránea. La aceituna se utiliza en todo el mundo con una amplia variedad de fines tales como la extracción de aceite de oliva y en alimentación, y muchas personas la han consumido durante mucho tiempo.

Se ha notificado que la aceituna contiene polifenoles tales como la oleuropeína, hidroxitirosol, y acteósido (Documentos no de patente 1 y 2), y que los extractos de olivo y sus compuestos de polifenol tienen diversas actividades que incluyen actividad antiarteroesclerótica (Documento de no patente 3), actividad antihipertensiva (Documento de patente 1), actividad de prevención de la pérdida de hueso (Documento de no patente 4). También se ha notificado que los extractos de olivo tienen efectos antioxidantes, blanqueadores, contra el envejecimiento de la piel, y antitumorales (Documento de patente 2).

El acteósido, uno de los polifenoles representativos incluidos en el olivo, es conocido por tener actividad antioxidante (Documento no de patente 2).

Por otra parte, se ha notificado que el DRA, que tiene una estructura en la que una unidad de ramnosa se ha eliminado del acteósido, está presente en diferentes plantas, incluidas plantas de *Scrophulariaceae* (por ejemplo, *Calceolaria hypericina*) de las que el DRA se aísla como calceolariósido A (Documentos no de patente 5), pero el DRA no se ha descubierto en el olivo. La comparación *in vitro* de las actividades antioxidantes ha demostrado que el acteósido es más activo que el DRA (Documento no de patente 6).

Sin embargo, la investigación sobre la absorción y excreción de los polifenoles, y el cambio dependiente del tiempo en sus actividades antioxidantes de la sangre, en seres humanos que consumen aceitunas ha demostrado que ambos parámetros son convergentes a corto plazo (Documento no de patente 7). Otro informe ha mostrado que el acteósido, que es conocido por tener actividad antioxidante, muestra baja capacidad de absorción cuando se ingiere por vía oral (Documento no de patente 8).

Listado de citas

DOCUMENTOS DE PATENTE

- [Documento de patente 1] Publicación de solicitud de patente japonesa JP 2005-334022
[Documento de patente 2] Publicación de solicitud de patente japonesa JP 2002-186453

DOCUMENTOS NO DE PATENTE

- [Documento no de patente 1] J. Agric Food Chem, vol. 52, págs. 479-484, 2004
[Documento no de patente 2] J. Agric Food Chem, vol. 53, págs. 8963-8969, 2005
[Documento no de patente 3] Atherosclerosis, vol. 188, n.º 1, págs. 35-42, 2006
[Documento no de patente 4] Clin Nutr, vol. 25, N.º 5, 859-868, 2006
[Documento no de patente 5] Gazzetta Chimica Italiana, 116, págs. 431-433, 1986
[Documento no de patente 6] Planta Medica, 70 (1), 50-53, 2004
[Documento no de patente 7] Phytomedicine, vol. 14, págs. 659-667, 2007
[Documento no de patente 8] J. Chromatogr. B, 844 (1), págs. 89-95, 2006

Sumario de la invención**Problema técnico**

Como se ha mencionado anteriormente, la aceituna contiene el polifenol antioxidante acteósido, pero este polifenol tiene baja capacidad de absorción en el organismo y no funciona bien cuando se ingiere por vía oral. Además, el acteósido solamente puede retener su actividad antioxidante durante un plazo de tiempo corto después de la ingestión, por tanto, para que el acteósido se pueda usar en forma de suplementos, se desea que el acteósido

retenga sus efectos más tiempo.

Un objeto de la presente invención es proporcionar alimentos que sean capaces de realizar eficazmente su función en el organismo vivo y retener su actividad acteósido de la sangre durante mucho tiempo.

5

Solución del problema

Para resolver los problemas anteriormente mencionados, los presentes inventores han realizado amplios estudios y, como resultado, han descubierto sorprendentemente que a diferencia de los resultados *in vitro*, el DRA muestra una mayor actividad antioxidante en el organismo vivo que el acteósido y, además, el DRA retiene su actividad antioxidante durante mayor tiempo porque se digiere de una forma diferente. Los inventores han descubierto también que puesto que el acteósido tiene mayor capacidad de absorción en el organismo que el acteósido, los metabolitos del DRA, el hidroxitirosol y el ácido cafeico, pueden realizar eficientemente sus diversas actividades fisiológicas. Los inventores han descubierto además que el DRA se puede preparar tratando el acteósido con una glicosidasa. Por tanto, los inventores han completado la presente invención, que se describe en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se resume en los siguientes puntos del (1) al (14):

- (1) Un extracto de olivo que comprende DRA (denominado a partir de ahora en el presente documento como "extracto de olivo que contiene DRA");
- (2) El extracto de olivo de acuerdo con el punto (1), que comprende DRA en una cantidad del 0,1 % en peso o mayor;
- (3) El extracto de olivo de acuerdo con el punto (2), que comprende DRA en una cantidad del 1 % en peso o mayor;
- (4) Una composición que comprende el extracto de olivo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (3);
- (5) La composición de acuerdo con el punto (4), en la que la composición es un alimento o una bebida;
- (6) Un alimento o bebida que comprende DRA en una cantidad del 0,1 % en peso o mayor;
- (7) El alimento o bebida de acuerdo con el punto (6), que comprende un extracto de olivo;
- (8) Un antioxidante de la sangre que comprende DRA;
- (9) El antioxidante de la sangre de acuerdo con el punto (8), que comprende DRA en una cantidad del 0,1 % en peso o mayor;
- (10) Una composición que comprende el antioxidante de la sangre de acuerdo con los puntos (8) o (9);
- (11) La composición de acuerdo con el punto (10), en la que la composición es un alimento o una bebida;
- (12) Un método para preparar una composición que contiene DRA, comprendiendo el método la etapa de tratar una composición que contiene acteósido con una glicosidasa que tiene actividad ramnosidasa;
- (13) El método de acuerdo con el punto (12), en el que la composición que contiene acteósido es un extracto de olivo;
- (14) El método de acuerdo con los puntos (12) o (13), en el que la glicosidasa es una naringinasa.

Efectos ventajosos de la invención

El extracto de olivo que contiene DRA de la presente invención presenta elevada actividad antioxidante en el organismo vivo durante un periodo de tiempo prolongado y, por tanto, es útil como alimento o bebida, quasi-fármaco, o sustancia farmacéuticamente activa.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo en la cantidad de DRA producido mediante reacción enzimática, donde el área del pico en HPLC se utiliza como índice.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo en la cantidad de acteósido que disminuye debido a la reacción enzimática, donde el área del pico en HPLC se utiliza como índice.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo en la actividad de FRAP (capacidad del plasma para reducir el férrico) de la sangre tras la administración de DRA o acteósido en forma de una suspensión en CMC.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo en la actividad de FRAP tras la administración de DRA en forma de una solución en aceite de oliva.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo en la actividad ORAC (capacidad de absorber oxígeno radicalario) de la sangre tras la administración de DRA o acteósido en forma de una suspensión en CMC.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo en la actividad ORAC tras la administración de DRA en forma de una solución en aceite de oliva.

La Fig. 7 es un dibujo que muestra el cambio dependiente del tiempo en las concentraciones de acteósido, DRA, hidroxitirosol y ácido cafeico en la sangre de ratas que recibieron una suspensión en CMC al 0,5 %.

La Fig. 8 es un dibujo que muestra el cambio dependiente del tiempo en las concentraciones de acteósido, DRA, hidroxitirosol y ácido cafeico en la sangre de ratas que recibieron una suspensión de 500 mg de acteósido en

CMC al 0,5 %.

La Fig. 9 es un dibujo que muestra el cambio dependiente del tiempo en las concentraciones de hidroxitirosol y ácido cafeico en la sangre de ratas que recibieron una suspensión de 423 mg de DRA en CMC al 0,5 %.

La Fig. 10 es un dibujo que muestra que la cantidad de DRA absorbido en el organismo (ABC) es mayor que la de acteósido.

La Fig. 11 es un dibujo que muestra el cambio dependiente del tiempo en la actividad de FRAP en sangre después de administrar en una sola dosis diferentes concentraciones de extractos que contienen DRA disueltos en aceite de oliva.

La Fig. 12 es un dibujo que muestra el cambio dependiente del tiempo en la actividad de FRAP en sangre después de administrar en una sola dosis una suspensión de un extracto de olivo que contiene DRA o un extracto de olivo no tratado enzimáticamente en aceite de oliva.

La Fig. 13 muestra la actividad de FRAP en sangre 9 horas después de la administración final de dosis consecutivas de un extracto de olivo que contiene DRA o un extracto de olivo no tratado enzimáticamente en forma de suspensión en aceite de oliva.

Descripción de las realizaciones

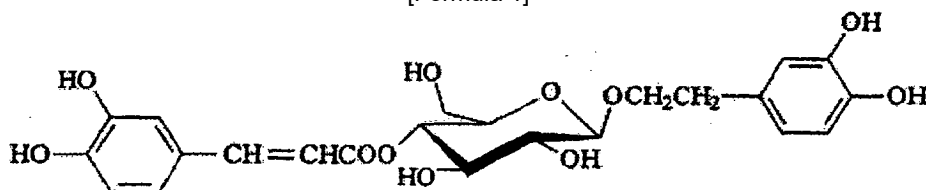
La presente invención se refiere a un extracto de olivo que comprende DRA en una cantidad del 0,1 % en peso o mayor y que presenta una elevada actividad antioxidante en el organismo vivo durante un periodo de tiempo prolongado, un alimento o bebida que comprende el extracto de olivo, y un método para preparar el mismo.

En las páginas que siguen, las realizaciones de la presente invención se describirán en mayor detalle.

<Extracto de olivo que contiene DRA>

El extracto de olivo que contiene DRA de la presente invención comprende DRA. La fórmula estructural del DRA se muestra a continuación.

[Fórmula 1]

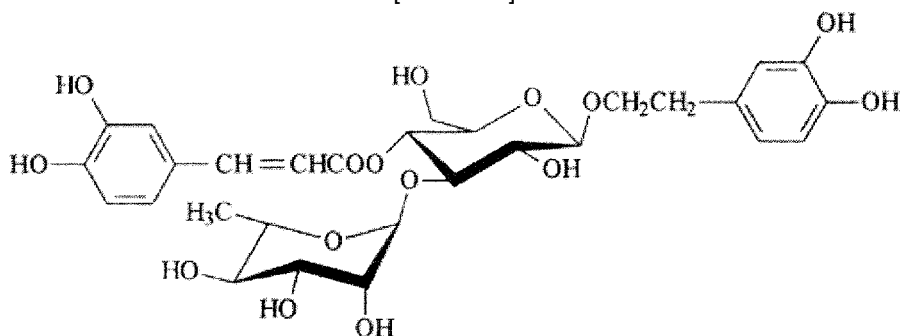


Como se ha mencionado anteriormente, DRA se aisló por primera vez como calceolariósido A a partir de plantas de *Scrophulariaceae* (por ejemplo, *Calceolaria hypericina*) en 1986, y desde entonces se ha notificado que está presente en diferentes plantas pero no se había encontrado en el olivo. Por otra parte, el extracto de olivo que contiene DRA de la presente invención puede contenerlo incluso solamente en una cantidad muy pequeña, y contenerlo en una cantidad del 0,1 % en peso o mayor, preferentemente del 1 % en peso o mayor, y más preferentemente del 5 % en peso o mayor.

DRA se puede obtener tratando enzimáticamente el acteósido mostrado a continuación o por cualquier otro método. Por ejemplo, se puede obtener el extracto de olivo que contiene DRA haciendo reaccionar un extracto de olivo que contiene acteósido en las condiciones adecuadas con una enzima capaz de eliminar un resto de ramnosa del acteósido, o mediante extracción de DRA a partir de un material vegetal que contiene DRA o similar y añadiéndolo a un extracto de olivo.

La fórmula estructural del acteósido se muestra a continuación.

[Fórmula 2]



Es suficiente que el DRA está contenido en el extracto de olivo que contiene DRA de la presente invención, y cualesquiera otros componentes pueden estar contenidos en este extracto de olivo sin limitación particular. Los ejemplos de otros componentes que se pueden incorporar incluye componentes derivados de aceitunas tales como acteósido e hidroxitirosol. El contenido de estos otros componentes y la relación relativa entre el DRA y dichos otros componentes se puede ajustar según se desee.

El olivo es una planta que pertenece al género *Olea* de la familia *Oleaceae*, y se puede utilizar cualquier variedad de olivo como material de partida para la preparación del extracto. Los ejemplos de variedades de aceituna que se puede usar ventajosamente incluyen Manzanilla, Lucca, Nevadillo Blanco, Mission, Picual, Arbequina, Hojiblanca, Cornicabra, Gordal, Moraiolo, Frantoio, Coratina, y Leccino.

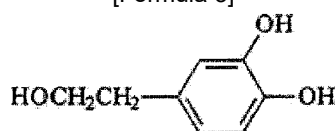
Para la preparación del extracto de olivo, se pueden usar cualesquiera partes de las plantas, tales como el fruto, las semillas, las hojas y el tallo, pero se utilizan aquellas partes con un contenido elevado en acteósido, como el fruto. La aceituna se puede usar en bruto o puede estar seca tal como criodesecada antes del uso. Además, los residuos que quedan después de la extracción del aceite de la aceituna se pueden utilizar directamente o en estado seco. La preparación del extracto de olivo se consigue sometiendo cualquiera de los materiales de partida anteriormente mencionados a una extracción con disolvente. El disolvente utilizado en la extracción con disolvente puede ser un disolvente polar o no polar. Los ejemplos de disolvente incluyen agua, alcoholes, tales como metanol o etanol, alcoholes polihidroxilados tales como etilenglicol, o propilenglicol, y cetonas, siendo preferida el agua caliente a 60-90 °C.

El extracto de olivo que contiene DRA de la presente invención tiene varios efectos debido a su contenido en DRA. Por ejemplo, como DRA tiene mayor capacidad de absorción en el organismo que el acteósido, los metabolitos del DRA, el hidroxitirosol y el ácido cafeico, pueden realizar más eficazmente sus diversas actividades fisiológicas. Adicionalmente, DRA retiene su actividad antioxidante de la sangre durante más tiempo después de la ingestión.

La cantidad de DRA o similar absorbido en el organismo se puede determinar mediante, por ejemplo, la administración de una solución de ensayo a un animal de ensayo, recogida de una muestra de sangre del animal después de un determinado periodo de tiempo, y realizar una medida de la concentración de la muestra. A modo de ejemplo, una rata en ayuno nocturno recibió por vía oral utilizando una sonda una suspensión de DRA en aceite de oliva (0,8 mM) a una dosis de 5 ml/kg. A intervalos regulares después de la administración, se recoge una muestra de sangre de la vena caudal de la rata en un tubo hematológico heparinizado y se centrifugó para obtener una muestra de plasma, y se realizó un análisis de concentración para determinar de esta forma la cantidad de DRA.

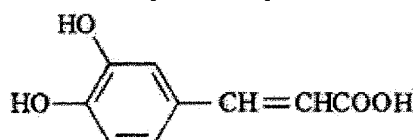
las fórmulas estructurales de los metabolitos de DRA, hidroxitirosol y ácido cafeico, se muestran a continuación.

[Fórmula 3]



Hidroxitirosol

[Fórmula 4]



Ácido cafeico

Se sabe que el hidroxitirosol tiene una actividad antioxidante muy intensa, y es capaz de evitar que el colesterol malo, LDL, se convierta en el colesterol peor, LDL oxidado.

Se sabe que el ácido cafeico es uno de los polifenoles contenidos en el café y es un componente de su aroma. Se ha notificado que el ácido cafeico es eficaz para suprimir el crecimiento y la metástasis de células cancerosas.

Los extractos de olivo se utilizan ampliamente como alimentos en todo el mundo, y muchas personas lo han consumido durante mucho tiempo. Por tanto, el extracto de olivo que contiene DRA de la presente invención se puede usar directamente como alimento, bebida o similar, o se puede incorporar a un alimento, bebida, sustancia farmacéuticamente activa o similar.

Cuando el extracto de olivo que contiene DRA se usa directamente como alimento, bebida o similar, se pueden

añadir otros componentes fisiológicamente activos, incluidos minerales, vitaminas tales como vitamina E, vitamina C, y vitamina A, componentes nutritivos, aromatizantes, pigmentos y otros aditivos, dependiendo de la necesidad, siempre que no afecten negativamente los efectos del DRA o, en otras palabras, que no interactúen desfavorablemente con DRA. Todos los aditivos que se pueden usar son los habitualmente utilizados en alimentos y bebidas.

El extracto de olivo que contiene DRA también se puede formular en alimentos funcionales (incluyendo alimentos saludables tales como alimentos suplementarios saludables, alimentos funcionales nutritivos, alimentos para uso dietario especial, y alimentos para uso saludable especial, así como en suplementos para animales), piensos para animales, y otros.

<Alimentos y bebidas>

La presente invención se refiere a alimentos y bebidas que comprenden el extracto de olivo de acuerdo con la invención.

DRA se puede obtener tratando enzimáticamente el acteósido o por cualquier otro método. Por ejemplo, se puede obtener un producto que contiene DRA haciendo reaccionar un producto que contiene acteósido en las condiciones adecuadas con una enzima capaz de eliminar un resto de ramnosa del acteósido, o mediante extracción de DRA a partir de un material vegetal que contiene DRA o similar.

El alimento o bebida de la invención se puede proporcionar en la forma de alimentos saludables tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos y preparaciones bebibles (incluidas soluciones y suspensiones) o en forma de bebidas refrescantes, bebidas de té, productos lácteos tales como bebidas de yogur y bebidas de fermentación láctica, condimentos, alimentos procesados, postres, dulces (por ejemplo, goma, caramelo, gelatina), y similares. El alimento o bebida de la presente invención puede contener excipientes, agentes aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes disgregantes, y/u otros aditivos que sean aceptables como ingredientes alimentarios.

Por tener actividad antioxidante, el alimento o bebida de la presente invención es eficaz para prevenir o mejorar trastornos, enfermedades, etc. asociadas con especies de oxígeno reactivas.

<Antioxidantes de la sangre>

Se divulgan en el presente documento antioxidantes de la sangre que contienen DRA.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha descubierto que, a diferencia de informes anteriores, se produce un aumento significativo en la actividad antioxidante de la sangre después de la administración de DRA, mientras que se produce poco aumento de la actividad antioxidante de la sangre después de la administración de acteósido. Además, DRA retiene sus efectos durante un tiempo prolongado; de forma que el antioxidante de la sangre que contiene DRA es un antioxidante de la sangre de liberación sostenida. Por tener actividad antioxidante, el antioxidante de la sangre es eficaz para prevenir o mejorar trastornos, enfermedades, etc. asociadas con especies de oxígeno reactivas.

La actividad antioxidante de la sangre se puede determinar, por ejemplo, por el uso del método de (capacidad del plasma para reducir el férrico) u ORAC (capacidad para absorber oxígeno radicalario).

La cantidad de DRA presente en el antioxidante de la sangre no está especialmente limitado pero, desde el punto de vista de sus efectos, esta cantidad es del 0,1 % en peso o mayor, preferentemente del 1 % en peso o mayor, más preferentemente del 2 % en peso o mayor, y aún más preferentemente del 5 % en peso o mayor. DRA se puede obtener tratando enzimáticamente el acteósido o por cualquier otro método. Por ejemplo, se puede obtener un producto que contiene DRA haciendo reaccionar un producto que contiene acteósido en las condiciones adecuadas con una enzima capaz de eliminar un resto de ramnosa del acteósido, o mediante extracción de DRA a partir de un material vegetal que contiene DRA o similar.

El antioxidante de la sangre se puede proporcionar en formas farmacéuticas orales tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos y jarabes o en formas farmacéuticas no orales tales como inyecciones. El antioxidante de la sangre puede contener excipientes farmacéuticamente aceptables, agentes aglutinantes, agentes de carga, agentes de dispersión, conservantes u otros aditivos.

El antioxidante de la sangre se puede usar directamente o incorporarse a un alimento, bebida, sustancia farmacéuticamente activa o similar.

Cuando el antioxidante de la sangre se usa directamente como alimento, bebida o similar, se pueden añadir otros componentes fisiológicamente activos, incluidos minerales, vitaminas tales como vitamina E, vitamina C, y vitamina A, componentes nutritivos, aromatizantes, pigmentos y otros aditivos, dependiendo de la necesidad, siempre que no afecten negativamente los efectos del DRA o, en otras palabras, que no interactúen desfavorablemente con DRA.

Todos los aditivos que se pueden usar son los habitualmente utilizados en alimentos y bebidas.

<Métodos para preparar una composición que contiene DRA>

- 5 El método de preparación de la presente invención prepara una composición que contiene DRA a partir de una composición que contiene acteósido. En particular, una composición que contiene DRA se puede preparar simplemente eliminando un resto de ramnosa del acteósido mediante tratamiento con glicosidasa.

- 10 La composición que contiene acteósido a utilizar como material de partida puede ser de cualquier tipo, siempre que contenga acteósido. Puede ser acteósido purificado o una mezcla de acteósido con cualquier otro compuesto polifenólico tal como oleuropeína o hidroxitirosol. También se pueden usar extractos vegetales que contienen acteósido. La concentración de acteósido en un material de partida se puede considerar adecuada teniendo en cuenta la cantidad de DRA a incluir en el producto previsto. Como se ha mencionado anteriormente, el olivo contiene acteósido en una cantidad relativamente grandes, y se puede obtener un extracto de olivo que contiene acteósido en la proporción deseada a partir del olivo usando un método conocido según sea adecuado; por tanto, el olivo es un material de partida preferido en el método de preparación de la presente invención. A este respecto, se prefiere la aceituna o, como alternativa, se puede usar una solución de extracto de aceituna en polvo.

- 20 Se puede usar cualquier glucosidasa sin limitación siempre que tenga actividad ramnosidasa para eliminar la ramnosa del acteósido. Las enzimas ilustrativas que tienen actividad ramnosidasa incluyen naringinasa y hesperidinasa. Las condiciones de tratamiento enzimático se pueden considerar como adecuadas teniendo en cuenta diversos factores entre los que se incluyen el pH y la temperatura de reacción óptima de la enzima a utilizar. Por ejemplo, en el caso de usar naringinasa, la reacción se realiza a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C, preferentemente de 35 a 45 °C, ajustando el pH en un intervalo de 3,5 a 5 usando un reactivo adecuado. Tras completar el tratamiento enzimático, la enzima se desactiva usando un método adecuado conocido, por ejemplo, ajustando la solución a un pH de 3 y realizando el calentamiento a 80 °C o más durante 10 minutos. La concentración de DRA deseada en una composición que contiene DRA producida se puede obtener ajustando adecuadamente la concentración de acteósido en un material de partida, la cantidad de enzima a añadir, el tiempo de reacción, y similares.

- 30 Las concentraciones de DRA y acteósido residual en una composición que contiene DRA obtenida por reacción enzimática se puede determinar por un método conocido del experto en la materia, tal como análisis de HPLC.

- 35 Es también posible utilizar DRA separado y purificado a partir de una composición que contiene DRA preparada. La separación y purificación de DRA se puede realizar según sea adecuado por un método conocido del experto en la materia, tal como extracción con disolvente o separación cromatográfica.

Ejemplos

- 40 En las páginas que siguen, la presente invención se va a describir por medio de Ejemplos, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo de preparación 1 Preparación de un extracto de olivo

- 45 Ocho kilogramos de residuos que quedaron después de la extracción del aceite de la aceituna se sometieron dos veces a extracción, cada vez durante 30 minutos, usando 32 l de agua caliente a 80 °C. Tras realizar la filtración con una malla de nailon (producida por Nippon Rikagaku Kikai Co., Ltd.; nombre de producto: NRS-500), los residuos se eliminaron mediante filtración con succión usando dos láminas de papeles de filtro n.º 131 (Φ330 mm) y 200 g de Hyflo Super-Cel (Nacalai Tesque, Inc.) para obtener de esta forma un extracto. La cantidad total del extracto se cargó en 5 l de resina Amberlite XAD7-HP (Rohm and Haas Japan K.K.) (tamaño de la columna: Φ14x32 cm) que se había lavado con acetona al 50 % y equilibrado con agua. Tras lavado con 5 l de agua, se realizó seguidamente la elución con 20 l de agua, 35 l de una solución de etanol al 15 %, y 20 l de una solución de etanol al 60 %. Cada una de la fracción eluida con etanol al 15 % y la fracción eluida con etanol al 60 % se concentraron a presión reducida y se criodesecaron para obtener 37,2 g y 66,0 g de productos fraccionados, respectivamente. De los dos productos fraccionados, el obtenido a partir de la fracción eluida con etanol al 60 % se usó en posteriores ensayos con animales como extracto de olivo (contenido de acteósido: 9,1 %).

Ejemplo de preparación 2 Preparación de acteósido

- 60 Cien gramos de un extracto en polvo de pulpa de olivo (Oleselect™ producido por Indena (lote n.º 10219)) se disolvieron en 1200 ml de metil etil cetona y 600 ml de agua destilada, y la solución se agitó bien en un embudo de decantación de 3 l de volumen para recuperar la capa orgánica. Se añadieron 1200 ml de metil etil cetona a la capa acuosa, y la solución se agitó bien para recuperar la capa orgánica, y se repitió el mismo procedimiento una vez más. Las capas orgánicas obtenidas en un total de tres rondas de separación se mezclaron, se concentraron y se criodesecaron para obtener 52,5 g de un producto seco.

La cantidad total del producto seco se disolvió en 200 ml de una solución de etanol acuoso al 70 % y se diluyó adicionalmente 10 veces con agua, y después se cargó en 1 l de MCI GEL CHP-20P (producido por Mitsubishi Chemical Corporation; 75-150 μ m) que se había equilibrado con agua. Después de pasar 10 l de una solución de etanol acuoso al 10 %, se realizó seguidamente la elución con 1 l de cada una de las soluciones de etanol acuoso al 12,5 %, 15 %, 17,5 %, 20 %, 22,5 %, 25 %, 27,5 %, 30 % y 35 % y 2 l de una solución de etanol acuoso al 40 % (todas las concentraciones de etanol se proporcionan en %V/V). Los eluatos del 12,5 % al 27,5 % se fraccionaron en 4 fracciones de 250 ml cada una y, de estas fracciones, en cuarto del eluato al 20 % hasta el tercero del eluato al 25 % se mezclaron y se concentraron para obtener 5,98 g de acteósido purificado.

10 Ejemplo 1 Preparación de DRAs -- 1

En primer lugar, 0,37 mg de naringinasa (derivada de *Penicillium decumbens*; 300 unidades/g; producida por Sigma) se suspendieron en 1,68 ml de un tampón acetato 0,1 M (pH 4,0) para preparar una solución de enzima de 0,22 mg/ml (abreviada como 1/10). La solución de enzima 1/10 se diluyó con un tampón acetato 0,1 M (pH 4,0) para preparar una solución de enzima diluida 3, 10 y 30 veces (abreviadas como 1/30, 1/100 y 1/300, respectivamente). 0,9 ml de cada una de las soluciones de enzima se introdujo en un tubo de ensayo de vidrio con tapón roscado, se añadieron 0,1 ml de una solución de etanol acuoso al 50 % (20 mg/ml) del acteósido purificado obtenido en el Ejemplo de preparación 2 y, a continuación, el tubo se agitó a 40 °C (a 100-130 ciclos/min usando el MM-10 Water Bath Shaker producido por Taiyo Kagaku Kogyo Co., Ltd. (ahora Tietech Co., Ltd.)). 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas después de iniciar la reacción, se tomaron 0,1 ml de la muestra, y para la desproteínización, se añadió una cantidad equivalente de acetonitrilo enfriado en hielo y la mezcla se agitó, se dejó reposar en hielo durante 10 minutos y se centrifugó (a 10.000 revoluciones durante 10 min a 5 °C usando la centrifuga de alta velocidad refrigerada MX-100 producida por Tomy Seiko Co., Ltd.). 4 μ l de cada una de las suspensiones obtenidas después de la centrifugación se sometió a análisis de HPLC en las siguientes condiciones. Las muestras tomadas de un control exento de enzima (abreviado como Ez(-)) a 5 y 24 horas después de la administración se trataron de la misma forma para comprobar la estabilidad del acteósido. Además, se realizó un análisis CL-EM para confirmar que el DRA se había producido mediante la reacción.

30 <Condiciones de análisis por HPLC>

Sistema: Waters 2690/2695 Módulos de separación y Detector de matriz de diodos 996

Columna: Develosil™ RPAQUEOUS-AR-5 (3x150 mm)

Fase Móvil: Solución A: ácido fórmico al 0,1 % - al 15 % en acetonitrilo/agua destilada; Solución B: ácido fórmico al 0,1 % - al 50 % en acetonitrilo/agua destilada

Programa: 0 min (0 % de Solución B) y 30 min. (100 % Solución B)

Caudal: 0,43 ml/min.

Volumen de inyección: 4 μ l

Longitud de onda de detección: 280 nm

En las condiciones de análisis anteriormente mencionadas, el DRA se eluyó a 8,958 $\pm$ 0,008 minutos (n=24) y el acteósido a 9,348 $\pm$ 0,009 minutos (n=18). Los resultados del cambio dependiente del tiempo en el área de los picos de HPLC como índice se muestran en las Figs. 1 y 2. Se confirmó que a medida que la cantidad de acteósido disminuye, DRA se produjo en mayor cantidad.

45 Ejemplo 2 Preparación de DRA -- 2

Cuatro gramos del acteósido purificado obtenido en el Ejemplo de preparación 2 se disolvieron en 100 ml de una solución de etanol acuoso al 50 %. La cantidad total de la solución resultante se añadió a 2 l de un tampón acetato 0,1 M (pH 4,0) la mezcla se mantuvo a 40 °C, y se añadieron 400 mg de naringinasa (derivada de *Penicillium decumbens*; 300 unidades/g; producida por Sigma). Inmediatamente después de la agitación a 40 °C durante 3 horas, la cantidad total del líquido de reacción se cargó sobre 700 ml de MCI GEL CHP-20P (producido por Mitsubishi Chemical Corporation; 75-150 μ m) que se había equilibrado con agua. Tras lavado con 2 l de agua, se pasaron 2 l de una solución de etanol acuoso al 15 % y 1200 ml de una solución de etanol acuoso al 20 %. A continuación, se realizó la elución con 750 ml de cada una de las soluciones de etanol acuoso al 22,5 %, 25 % y 27,5 %, y cada uno de los eluatos se fraccionó en tres fracciones de 250 ml cada una. Se llevó a cabo elución adicional con 1250 ml de una solución de etanol acuoso al 30 %, y el eluato se fraccionó en cinco fracciones de 250 ml cada una. De estas fracciones, una mezcla de la primera y segunda fracciones del eluato del 27,5 % y una mezcla de la tercera fracción del eluato del 27,5 % con la tercera fracción del eluato del 30 % se concentraron por separado para obtener 438 mg y 1,562 g de productos secos, respectivamente. Se realizaron análisis por EM y RMN sobre el producto seco de la mezcla de la tercera fracción del eluato del 27,5 % a la tercera fracción del eluato del 30 % para confirmar que el DRA se había producido mediante la reacción.

Ejemplo 3 Preparación de A Extracto de olivo que contiene DRA -- 1

Ciento sesenta mililitros de agua destilada se incubaron a 40 °C, se añadieron 20 ml de una solución de etanol acuoso al 50 % de 4 g de un extracto en polvo de pulpa de olivo (Oleaselect™ producido por Indena (lote

n.º 10219)), y la mezcla se agitó (el pH en esta etapa fue pH 4,7); a continuación, el pH de la mezcla se ajustó a 4,0 con ácido acético glacial. A continuación, se añadieron 20 ml de una suspensión de 40 mg de naringinasa (derivada de *Penicillium decumbens*; 300 unidades/g; producida por Sigma) en agua destilada para iniciar la reacción. A los 0,5 minutos, en intervalos de 2 minutos de 2 a 30 minutos, y a intervalos de 30 minutos de 60 a 210 minutos, se tomaron 100 µl de la muestra, y para la desproteínización, se añadió una cantidad equivalente (100 µl) de acetonitrilo enfriado en hielo y la mezcla se agitó y se centrifugó (a 10.000 revoluciones durante 10 min a 5 °C usando la centrifuga de alta velocidad refrigerada MX-100 producida por Tomy Seiko Co., Ltd.). Después de calentar durante 210 minutos, el pH del líquido de reacción fue 4,1. Además, una muestra obtenida después de añadir agua destilada en lugar de una solución de enzima y tratar la mezcla de la misma forma se usó como control. 4 µl de cada una de las suspensiones obtenidas después de la centrifugación se sometió a análisis de HPLC para determinar las área de pico del DRA y acteósido. Adicionalmente, los líquidos preparados mediante dilución por etapas de cada uno de DRA y acteósido con acetonitrilo al 50 % se analizaron en las mismas condiciones para construir las curvas de calibración ($R^2 = 0,9999$ para la curva de calibración de DRA, y $R^2 = 1$ para la curva de calibración de acteósido). Las muestras de DRA y acteósido utilizadas para construir las curvas de calibración fueron las obtenidas en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo de preparación 2, respectivamente. Las concentraciones se calcularon a partir de los valores del área de pico y las curvas de calibración para determinar el contenido de DRA y acteósido en las muestras originales (la concentración tras el análisis fue equivalente a 10 mg/ml) de acuerdo con la siguiente ecuación de cálculo. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

<Condiciones de análisis por HPLC>

Sistema: Waters 2690/2695 Módulos de separación y Detector de matriz de diodos 996

Columna: Develosil™ RPAQUEOUS-AR-5 (3x150 mm)

Fase Móvil: Solución A: ácido fórmico al 0,1 % - al 15 % en acetonitrilo/agua destilada; Solución B: ácido fórmico al 0,1 % - al -60 % en acetonitrilo/agua destilada

Programa: 0 min (0 % de Solución B) y 30 min. (100 % Solución B)

Caudal: 0,43 ml/min.

Volumen de inyección: 4 µl,

Longitud de onda de detección: 280 nm

<Ecuación de cálculo>

La concentración de la muestra tras la reacción fue 20 mg/ml, y la concentración de la muestra tras el análisis fue equivalente a 10 mg/ml porque la muestra se diluyó 2 veces con acetonitrilo y, por tanto, la ecuación de cálculo se expresa de la siguiente forma:

$$\text{Contenido (\%)} = 100 \times \text{Concentración (\mu g/ml)} / 10000 (\mu g/ml).$$

La Tabla 1 muestra los cambios dependientes del tiempo en el contenido de DRA y acteósido. Se confirmó que a medida que la cantidad de acteósido disminuye, DRA se produjo en mayor cantidad.

[Tabla 1]

Tiempo de reacción (min.)	Contenido (%)	
	Desramnosil acteósido	Acteósido
0,5	0,0	10,6
2	0,1	10,5
4	0,3	9,9
6	0,5	9,9
8	0,7	9,6
10	0,8	9,3
12	1,0	9,4
14	1,2	9,1
16	1,4	8,9
18	1,6	8,9
20	1,7	8,6
22	1,9	8,5
24	2,0	8,1
26	2,3	8,5
28	2,4	8,1
30	2,8	8,2

(continuación)

Tiempo de reacción (min.)	Contenido (%)	
	Desramnosil acteósido	Acteósido
60	4,9	5,3
90	6,4	2,9
120	7,5	1,5
150	8,1	0,8
180	8,1	0,4
210	8,4	0,0
0 (Control)		10,6

Ejemplo 4 Preparación de A Extracto de olivo que contiene DRA -- 2

5 <Extracción>

Dos kilogramos de residuos que quedaron después de la extracción del aceite de la aceituna se sometieron a extracción usando 16 l de agua caliente a 80 °C durante 2 horas. Tras realizar la filtración con una malla de nailon (producida por Nippon Rikagaku Kikai Co., Ltd.; nombre de producto: NRS-500), los residuos se eliminaron mediante
10 filtración con succión usando dos láminas de papeles de filtro n.º 13 1 (Φ330 mm) y 400 g de Hyflo Super-Cel (Nacalai Tesque, Inc.) para obtener de esta forma un extracto.

<Reacción de desramnosilo>

15 El extracto se enfrió a 40 °C, y se añadieron 32 ml de ácido acético para reducir el pH a 3,93. Mientras la temperatura se mantuvo a 40 °C en un baño de aceite, se añadieron 130 mg de naringinasa (derivada de *Penicillium decumbens*; 540 unidades/g; producida por Sigma) y la reacción se realizó durante 3,5 horas. Para terminar la reacción, la enzima se desactivó añadiendo 35 ml de ácido sulfúrico 6 N para ajustar el pH a 3,0 y realizar el calentamiento a 80 °C durante 10 minutos. A continuación, el líquido de reacción se enfrió a 40 °C o menos en un
20 baño de agua, y se añadió la cantidad equivalente (52,5 ml) de una solución acuosa de NaOH 4 N.

<Purificación>

25 La cantidad total del líquido de la reacción anterior se cargó en 1 l de resina Amberlite XAD7-HP (Rohm and Haas Japan K.K.) (tamaño de la columna: Φ8x20 cm) que se había lavado con acetona al 50 % y equilibrado con agua. Tras lavado con 2 l de agua, la elución se realizó secuencialmente con 6 l de una solución de etanol al 15 %, y 4 l de una solución de etanol al 60 %. Cada una de la fracción eluida con etanol al 15 % y la fracción eluida con etanol al 60 % se concentraron a presión reducida y se criodesecaron para obtener 8,73 g y 16,8 g de productos fraccionados, respectivamente. De los dos productos fraccionados, el obtenido a partir de la fracción eluida con
30 etanol al 60 % se usó en posteriores ensayos con animales como extracto de olivo que contenía DRA (contenido de DRA: 8,9 %).

Ejemplo 5 Actividad antioxidante de la sangre de DRA

35 <Método de determinación>

La influencia de DRA sobre la actividad antioxidante de la sangre se evaluó usando ratas. La evaluación de la actividad antioxidante de la sangre se realizó con los métodos FRAP y ORAC. El DRA y el acteósido utilizado en esta evaluación fueron los preparados con los mismos procedimientos que en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo de
40 preparación 2, respectivamente.

Ratas SD (IGS) macho (6 semanas de edad) se adquirieron de Charles River Laboratories Japan, Inc. Una vez que las ratas se aclimataron al entorno de ensayo durante una semana, las ratas que crecieron con normalidad se sometieron a ensayo. Se dejó ayunar a las ratas durante la noche y se dividieron en cinco grupos, compuesto cada
45 uno por tres ratas. Las ratas recibieron por vía oral una solución de CMC al 0,5 % (Grupo 1), una solución de DRA en CMC al 0,5 % (0,8 mM) (Grupo 2), una suspensión de acteósido purificado en CMC al 0,5 % (0,8 mM) (Grupo 3), una solución de aceite de oliva (Nacalai Tesque, Inc.; n.º de código 073-26) (Grupo 4), y una suspensión de DRA en aceite de oliva (0,8 mM) (Grupo 5), cada uno a una dosis de 5 ml/kg. Antes de la administración, y a las 0,5, 1, 3, 6, 9 y 24 horas después de la administración para los Grupos 1-3, o antes de la administración y a las 1, 3, 6, 9 y 24
50 horas después de la administración para los Grupos 4-5, se recogió una muestra de sangre de la vena caudal en tubos heparinizados y se centrifugó (a 8.000 rpm durante 10 min) para obtener una muestra de plasma. En una fecha posterior, se evaluaron la actividad de FRAP así como la actividad de ORAC en plasma de los sobrenadantes tras desproteinización con acetona.

Los resultados se muestran en las Figs. 3-6. El grupo del acteósido mostró poco aumento en la actividad antioxidante de la sangre mientras que los grupos de DRA mostraron un aparente aumento en la actividad antioxidante de la sangre tras la administración. Especialmente desde el punto de vista de la actividad de FRAP, la actividad antioxidante, mostró picos bimodales en un momento anterior (1-3 horas) y a 9 horas después de la administración; por tanto, se confirmó que DRA tiene una propiedad de liberación sostenida.

Ejemplo 6 Absorción en el organismo

Entre las muestras de plasma recogidas para la determinación de la actividad antioxidante de la sangre en el Ejemplo 5, algunas partes de estas muestras del Grupo 1 (una solución de CMC al 0,5 %), Grupo 2 (una suspensión de DRA en CMC al 0,5 %) y Grupo 3 (una suspensión de acteósido en CMC al 0,5 %) se usaron para determinar las concentraciones en sangre de las respectivas muestras después de la administración.

<Método de determinación>

Después de mezclar y homogeneizar cantidades equivalentes de muestras de plasma procedente de las tres ratas de cada grupo, 90 µl de una β-glucuronidasa *derivada de helix pomatia* /arilsulfatasa/tampón acetato (pH 5,0) se añadieron a 90 µl de la mezcla de plasma y la incubación se realizó a 37 °C durante una hora. Tras añadir 900 µl de acetonitrilo para terminar la reacción, se añadieron 10 µl de una solución acuosa de ácido ascórbico al 1 % y 10 µl de una solución de patrón interno, y el contenido se mezcló y se centrifugó a (15.000 rpm durante 10 min) para recuperar un sobrenadante. El sobrenadante recuperado se concentró a presión reducida, se volvió a disolver en metanol al 50 %, se hizo pasar por un filtro, y se sometió a análisis por CL-EM/EM para cuantificar el acteósido, DRA, hidroxitirosol, y ácido cafeico. Las cantidades de acteósido, DRA, hidroxitirosol, y ácido cafeico se determinaron mediante la proporción de cada una de sus áreas de pico con el área del pico de la hesperidina (Wako) utilizada como patrón interno. Las condiciones del análisis por CL-EM/EM se muestran a continuación.

<Condiciones de análisis por HPLC>

Columna: ACQUITY BEH18 (1,7 µm, 2,1Φx100 mm; Waters Japan Inc.)

Fase Móvil: Solución A: solución de ácido fórmico acuoso al 0,1 %; Solución B: acetonitrilo

Caudal: 0,30 ml/min.

Gradiente: Solución B al 5 % durante 5 minutos; Solución B del 5 % al 10 % durante 5 minutos; Solución B al 10 % durante 2 minutos; Solución B del 10 % al 24 % durante 7 minutos; y un gradiente lineal de Solución B del 24 % al 80 % durante 4 minutos

<Condiciones de análisis EM/EM>

Modo de determinación: Control de la reacción seleccionada

Detección:

acteósido (tiempo de retención: aproximadamente 17,4 min.); ion precursor a $m/z = 623$ ($[M-H]^+$), ion producto a $m/z = 161$

DRA (tiempo de retención: aproximadamente 17,0 min.); ion precursor a $m/z = 477$ ($[M-H]^+$), ion producto a $m/z = 161$

hidroxitirosol (tiempo de retención: aproximadamente 3,1 min.); ion precursor a $m/z = 153$ ($[M-H]^+$), ion producto a $m/z = 123$

ácido cafeico (tiempo de retención: aproximadamente 8,1 min.); ion precursor a $m/z = 179$ ($[M-H]^+$), ion producto a $m/z = 135$

Hesperidina (tiempo de retención: aproximadamente 18,7 min.); ion precursor a $m/z = 609$ ($[M-H]^+$), ion producto a $m/z = 301$

Método de ionización: IEP

Los resultados se muestran en las Figs. 7, 8 y 9. En el caso de administración de acteósido, la concentración máxima en sangre ($C_{máx.}$) de acteósido no alcanzó siquiera 1 µM, pero se detectaron sus metabolitos, hidroxitirosol y ácido cafeico. Los valores de $C_{máx.}$ de hidroxitirosol y ácido cafeico fueron 11,7 µM y 0,7 µM, respectivamente. Por otra parte, en el caso de administración de DRA, la $C_{máx.}$ de DRA tampoco alcanzó siquiera 1 µM, pero se detectaron sus metabolitos, hidroxitirosol y ácido cafeico, a elevadas concentraciones. Los valores de $C_{máx.}$ de hidroxitirosol y ácido cafeico fueron 32,8 µM y 7,3 µM, respectivamente.

Tanto el acteósido como el DRA no se absorbieron ni se transfirieron a la sangre tal cual eran, y estaban presente en el organismo en la forma de sus metabolitos, hidroxitirosol y ácido cafeico. Por tanto, las cantidades de acteósido y DRA absorbidas en el organismo se compararon usando las ABX de sus metabolitos hidroxitirosol y ácido cafeico, y los resultados de esta comparación se muestran en la Fig. 10. La cantidad de DRA absorbido en el organismo fue aproximadamente 3 veces mayor que la del acteósido de acuerdo con la comparación entre las ABC de sus hidroxitirosoles, o fue de aproximadamente 13 veces mayor que de acuerdo con la comparación entre las ABC de

sus ácidos cafeicos.

Los resultados anteriormente mencionados sugieren que cuando se compara con acteósido, DRA se absorbe en el organismo en mayores cantidades y sus metabolitos hidroxitirosol y ácido cafeico muestran diversas actividades fisiológicas a niveles más elevados.

Ejemplo 7 Evaluación de la dependencia de la dosis sobre la actividad antioxidante de la sangre

Se compararon las actividades antioxidantes de la sangre se los extractos de olivo que contienen diferentes concentraciones de DRA.

<Método de determinación>

Ratas SD (IGS) macho (6 semanas de edad) se adquirieron de Charles River Laboratories Japan, Inc. Una vez que las ratas se aclimataron al entorno de ensayo durante una semana, dichas ratas que crecieron normalmente se dejaron ayunar durante la noche, y se dividieron en cinco grupos, compuesto cada uno por cuatro ratas. Un extracto de olivo que contiene DRA se preparó usando el DRA preparado según el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2 y el extracto de olivo obtenido en el Ejemplo de preparación 1. El extracto de olivo que contiene DRA se disolvió en un aceite de oliva para preparar soluciones para administrar cada una de ellas que contenía DRA a concentraciones de 0, 0,5, 1,2 o 5 %. Cada una de las soluciones se administraron por vía oral a una dosis de 5 ml/kg. Antes de la administración, y a las 1, 3, 6, 9 y 24 horas después de la administración, se recogió una muestra de sangre de la vena caudal en tubos heparinizados y se centrifugó (a 8.000 rpm durante 10 min) para obtener una muestra de plasma. En una fecha posterior, se determinó la actividad de FRAP en plasma.

Los resultados se muestran en la Fig. 11. La actividad antioxidante de la sangre aumentó en DRA de una forma dependiente de la dosis, y un aparente efecto de elevación sobre la actividad antioxidante de la sangre se observó a concentraciones de DRA del 2 % o superior.

Ejemplo 8 Actividad antioxidante de la sangre

Las actividades antioxidantes de la sangre de los extractos de olivo que se habían sometido o no a la reacción de desramnosilo se compararon en términos de FRAP.

<Método de determinación>

Las muestras usaron en esta determinación fueron que el extracto de olivo que contiene DRA (contenido de DRA: 8,9 %) preparado en el Ejemplo 4 y un extracto de olivo no enzimáticamente tratado (contenido de acteósido: 9,1 %) obtenido en el mismo tratamiento que en el Ejemplo 4 salvo que no se realizó ninguna reacción de desramnosilo.

Ratas SD (IGS) macho (6 semanas de edad) se adquirieron de Charles River Laboratories Japan, Inc. Una vez que las ratas se aclimataron al entorno de ensayo durante una semana, las ratas que crecieron con normalidad se sometieron a ensayo. Se dejó ayunar a las ratas durante la noche y se dividieron en tres grupos, compuesto cada uno por cuatro ratas. Las ratas recibieron una solución de aceite de oliva por vía oral (Grupo 1), una suspensión del extracto de olivo que contiene DRA en aceite de oliva (Grupo 2), y una suspensión del extracto de olivo no enzimáticamente tratado (Grupo 3), cada una a una dosis de 500 mg/5 ml/kg. Antes de la administración, y a las 1, 3, 6, 9 y 24 horas después de la administración, se recogió una muestra de sangre de la vena caudal en tubos heparinizados y se centrifugó (a 8.000 rpm durante 10 min) para obtener una muestra de plasma. En una fecha posterior, se determinó la actividad de FRAP en plasma.

Los resultados se muestran en la Fig. 12. Se confirmó que la actividad antioxidativa se eleva al aumentar el contenido de DRA mediante el tratamiento enzimático.

Ejemplo 9 Propiedad de liberación sostenida de DRA

Los animales y las soluciones de ensayo para administración se proporcionaron por los mismos procedimientos que en el Ejemplo 8. La administración se repitió cada 24 horas durante 5 días consecutivos a una dosis de 500 mg/5 ml/kg, y 9 horas después de la administración final, se recogió una muestra de sangre en un tubo heparinizado y se centrifugó (a 8.000 rpm durante 10 min) para obtener una muestra de plasma. En una fecha posterior, se determinó la actividad de FRAP en plasma.

Los resultados se muestran en la Fig. 13. En comparación con el grupo del extracto de olivo no enzimáticamente tratado, el grupo del extracto de olivo que contiene DRA mostró un aumento significativo de la actividad antioxidante de la sangre a las 9 horas después de la administración final; por tanto, se confirmó que DRA tiene una propiedad de liberación sostenida.

Ejemplos de formulación 1 Comprimido

	(Cantidad por comprimido)
Extracto de olivo que contiene DRA (contenido de DRA: 8,9 %)	25 mg
Anhídrido silícico	5 mg
Celulosa microcristalina	120 mg
Maltitol	150 mg

- 5 Los componentes anteriormente mencionados se mezclaron uniformemente y se comprimieron en una máquina empastilladora de un solo punzón para preparar un comprimido que tenía 10 mm y pesaba 300 mg. La dosis recomendada es de 4 comprimidos al día.

Ejemplo de formulación 2 Gránulos

	(Cantidad por bastoncillo)
Extracto de olivo que contiene DRA (contenido de DRA: 8,9 %)	150 mg
Almidón de maíz	400 mg
Maltitol	1.000 mg

- 10 Una vez que los componentes anteriormente mencionados se mezclaron uniformemente, se añadieron 100 ml de una solución de hidroxipropil celulosa al 10 % en etanol, y la mezcla se amasó para homogeneizar, se extruyó de acuerdo con los métodos convencionales para obtener gránulos. La dosis diaria es un bastoncillo que contiene 1,5 g de gránulos.

Ejemplo de formulación 3 Cápsula blanda

Las cantidades relativas por cápsula se muestran a continuación. la dosis recomendada es de 2 cápsulas al día.

	(% en peso)
Gelatina	70,0
Glicerina	29,7
Caramelo	0,3
Agua	Cantidad adecuada
Total	100

- 20 Una cápsula de envoltura blanda compuesta por los componentes anteriormente mencionados se rellenó con la composición mencionada a continuación de acuerdo con un método convencional para obtener una cápsula blanda de 300 mg. La dosis recomendada de esta cápsula blanda es de 2 cápsulas al día.

	(Cantidad por cápsula)
Extracto de olivo que contiene DRA (contenido de DRA: 8,9 %)	50 mg
Ceras de abejas	0,02 ml
Aceite de oliva	0,1 ml

Ejemplo de formulación 4 Preparación bebible

Aromatizante:	DL-tartrato disódico	0,1 g
	Ácido succínico	0,009 g
Edulcorante:	Azúcar líquido	800 g
Vitamina C		10 g
Extracto de olivo que contiene DRA (contenido de DRA: 8,9 %)		1 g
Vitamina E		30 g
Ciclodextrina		5 g
Aromatizante		15 ml
Cloruro de potasio		1 g
Sulfato de magnesio		0,5 g

- 30 Los componentes anteriormente mencionados se mezclaron con agua para producir un volumen de 10 l. Esta preparación bebible se proporciona a una sola dosis de aproximadamente 100 ml.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan alimentos y bebidas que presentan una elevada actividad antioxidante en el organismo vivo durante un periodo de tiempo prolongado.

5

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de olivo que comprende desramnosil acteósido en una cantidad del 0,1 % en peso o mayor.
- 5 2. El extracto de olivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende desramnosil acteósido en una cantidad del 1 % en peso o mayor.
3. Una composición que comprende el extracto de olivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 10 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la composición es un alimento o una bebida.
5. Un alimento o bebida que comprende el extracto de olivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 15 6. Un método para preparar una composición que contiene desramnosil acteósido, comprendiendo el método la etapa de tratar una composición que contiene acteósido con una glicosidasa que tiene actividad ramnosidasa.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la composición que contiene acteósido es un extracto de olivo.
- 20 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que la glicosidasa es naringinasa.

FIG. 1

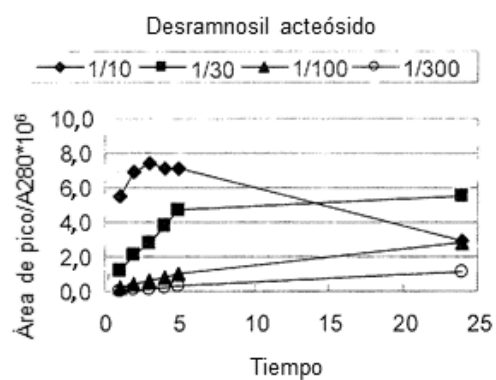


FIG. 2

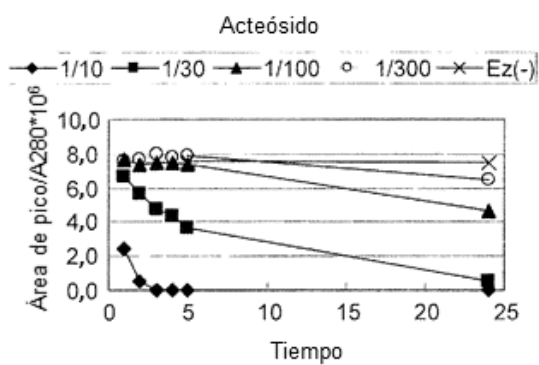


FIG. 3

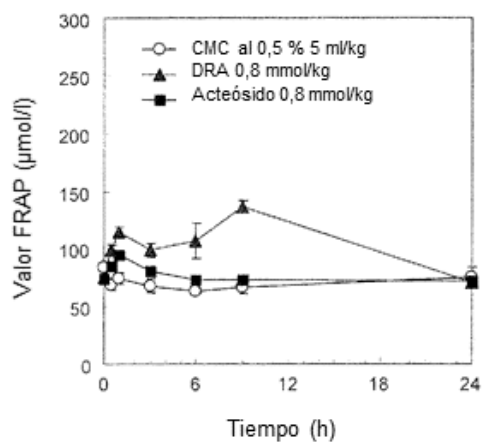


FIG. 4

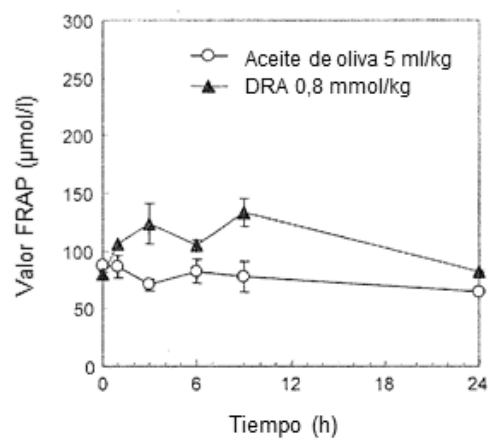


FIG. 5

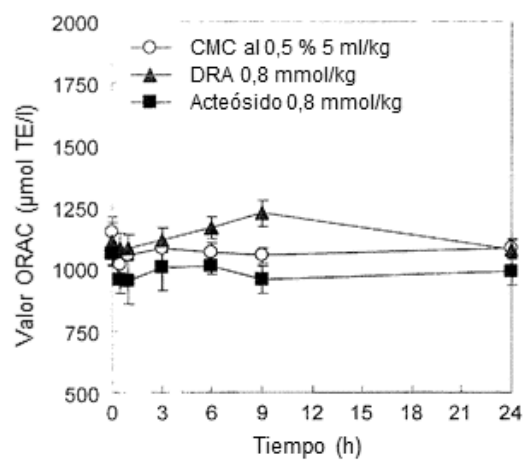


FIG. 6

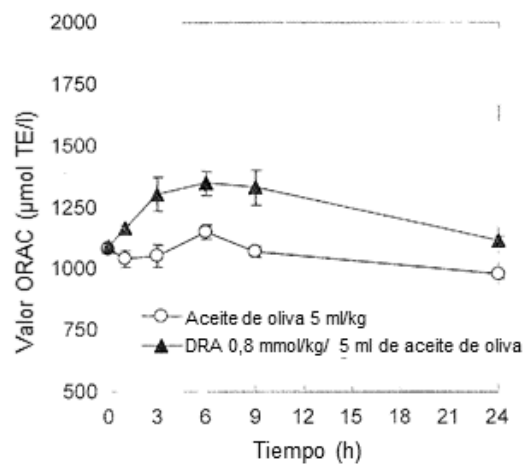


FIG. 7

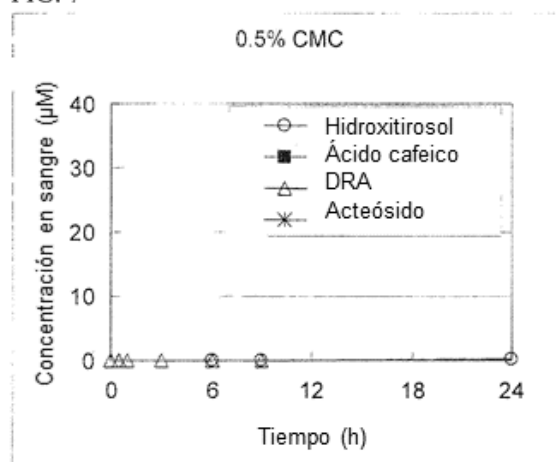


FIG. 8

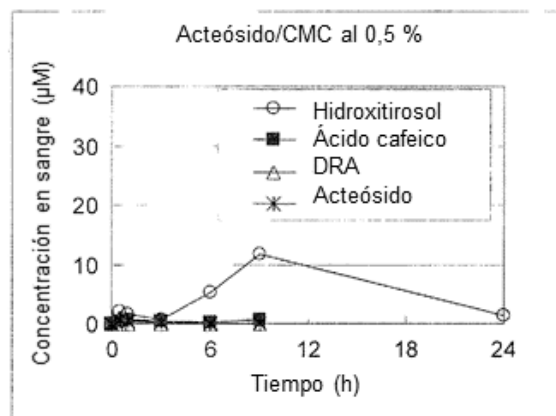


FIG. 9

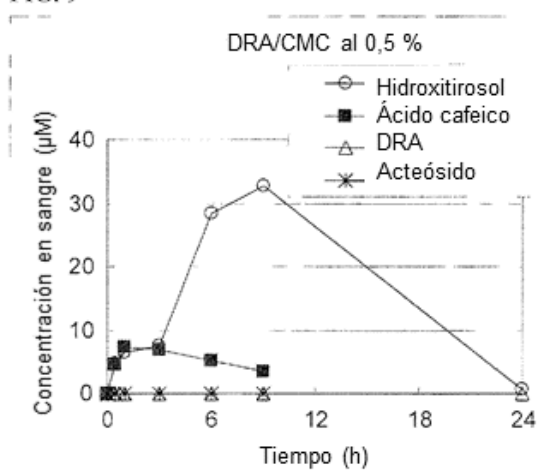


FIG. 10

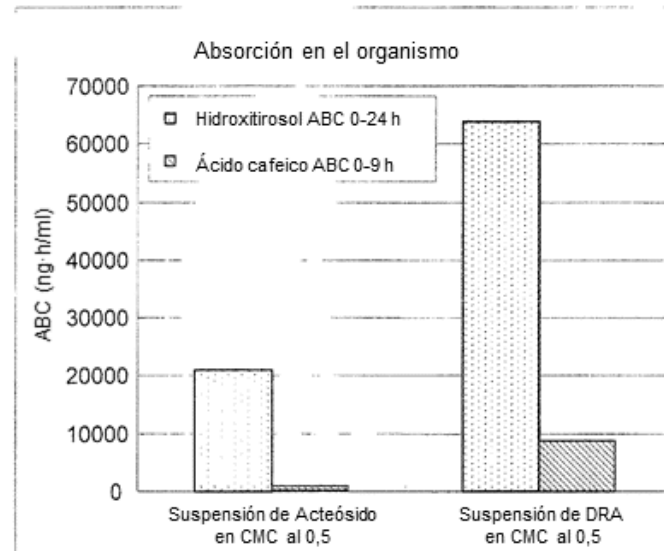


FIG. 11

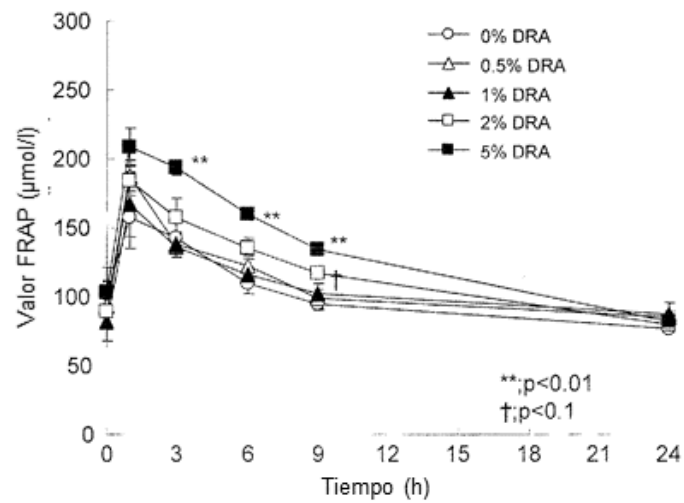


FIG. 12

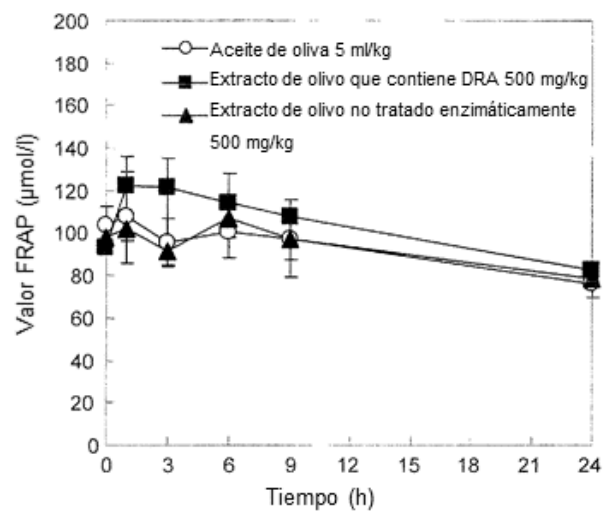


FIG. 13

