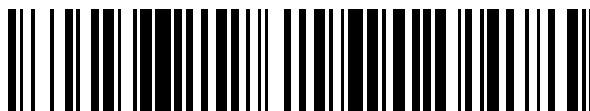


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 221**

51 Int. Cl.:

A61K 8/60 (2006.01)

A61K 8/66 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A23L 33/18 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A23L 33/17 (2006.01)

A23L 33/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2006** **E 06017678 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 1891967**

54 Título: **Absorción duradera de flavonoides**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.06.2020

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 764 221 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

Absorción duradera de flavonoides

5 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere a composiciones que llevan flavonoides con contenido de ramnosa y α -ramnosidasa. También incluye composiciones que contienen hesperidina y hesperetina-7-glucósido.

10 **Antecedentes**

Los flavonoides o bioflavonoides son un grupo ubicuo de sustancias polifenólicas que se hallan en la mayoría de las plantas y están concentrados en las semillas, en la piel o en la cáscara de los frutos, en la corteza y en las flores. Un gran número de medicinas vegetales contienen flavonoides, que según muchos autores tienen acción antibacteriana, antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica, antimutágena, antiviral, antineoplásica, antitrombótica y vasodilatadora.

Los desarrollos últimos descritos en la patente WO 2005/058255 A1 también demuestran que las composiciones que contienen flavanonas son beneficiosas para mejorar la salud de la piel, del cabello y del pelaje de humanos o mascotas.

20 En la naturaleza estos compuestos existen principalmente como glucósidos. Esta conjugación con los azúcares incide notablemente en su cinética de absorción. Así, por ejemplo, los glucósidos flavonoides tienen una absorción rápida y temprana, mientras que los rutinósidos flavonoides (glucósidos de ramnosa) tienen una absorción lenta y tardía.

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

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

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

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

40 Nielsen y otros han demostrado en el Journal of Nutrition, 2006, 136, 404-408 que la biodisponibilidad de la hesperidina en el zumo de naranja se mejora mediante la conversión enzimática de la hesperidina en hesperetina-7-glucósido con una solución de hesperidinasa.

45 La patente US 2004/071685 A1 se refiere a una composición y a un método para aumentar la biodisponibilidad de los isoflavonoides y de los polifenoles vegetales en un sujeto.

Objeto de la presente invención

50 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar formas alternativas mediante las cuales las composiciones de flavonoides tengan un efecto controlado en mamíferos.

Resumen de la presente invención

55 En consecuencia, esta necesidad se resuelve según las características de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes desarrollan la idea principal de la presente invención.

Así, en un primer aspecto de la presente invención se prepara una composición que lleva al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α -ramnosidasa, de forma que la α -ramnosidasa no tiene contacto directo con el flavonoide y está

60 (i) encapsulada
o

(ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal.

65 Las composiciones de la presente invención están formuladas para uso cosmético, nutricional y farmacéutico.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de α -ramnosidasa en una composición que lleva un flavonoide con contenido de ramnosa, de forma que la α -ramnosidasa no tiene contacto directo con el flavonoide, para mejorar la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de dicho flavonoide, y donde la α -ramnosidasa está

(i) encapsulada

o

(ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de α -ramnosidasa y de al menos un flavonoide con contenido de ramnosa, de forma que la α -ramnosidasa no tenga contacto directo con el flavonoide, en la fabricación de una composición para mejorar la salud de la piel, y donde la α -ramnosidasa está

(i) encapsulada

o

(ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal.

El uso cosmético de las composiciones de la presente invención también representa otra faceta de la misma.

Aquí también se revela un método para mantener y/o mejorar la biodisponibilidad de los flavonoides con contenido de ramnosa, el cual comprende la etapa de preparar una composición que lleve al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α -ramnosidasa, de forma que dicha α -ramnosidasa no tenga contacto directo con dicho flavonoide, y donde la α -ramnosidasa está

(i) encapsulada

o

(ii) se proporciona aparte de la composición que lleva el flavonoide con contenido de ramnosa.

Aquí también se revela un método para prolongar los niveles plasmáticos de los metabolitos de los flavonoides con contenido de ramnosa, tras la ingestión de dicho flavonoide, el cual comprende la etapa de administrar oralmente una composición que lleva al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α -ramnosidasa, de tal forma que dicha α -ramnosidasa no está en contacto directo con dicho flavonoide, y donde la α -ramnosidasa está

(i) encapsulada

o

(ii) se proporciona aparte de la composición que lleva el flavonoide con contenido de ramnosa.

Figuras

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

- la figura 1a representa la estructura molecular de la hesperidina.
- la figura 1b representa la estructura molecular de la hesperetina-7-glucósido,
- la figura 1c representa la estructura molecular de la hesperetina, y
- la figura 2 es un gráfico comparativo de los niveles plasmáticos de hesperetina, dependiendo de si se ingiere solo hesperetina-7-glucósido, solo hesperidina o de si se consume una composición según la presente invención.

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a formas de controlar la absorción de flavonoides con contenido de ramnosa en los mamíferos de modo que, después de la ingestión de dicho flavonoide, la absorción se produzca por igual en el tracto gastrointestinal superior e inferior o a lo largo de todo el mismo.

Así, el principio básico subyacente a la presente invención para conseguir un efecto duradero y regulado consiste en proporcionar de manera controlada un flavonoide que esté en una forma absorbible, al menos parcialmente, a lo largo de todo su paso por el tracto gastrointestinal de un mamífero. El flavonoide suele hidrolizarse, al menos parcialmente, en el tracto gastrointestinal superior y también en el colon.

Según la presente invención, la presencia de α -ramnosidasa en una fase temprana de la digestión (estómago, intestino delgado) permite, en cierta medida, la escisión parcial de los flavonoides que contienen ramnosa. Como consecuencia los flavonoides pueden absorberse más al principio del proceso de digestión. Además, los enzimas existentes de forma natural en el colon favorecen el proceso de escisión, de modo que los flavonoides son absorbidos continuamente a lo largo de su paso por el tracto gastrointestinal.

Por consiguiente, la presente invención propone composiciones que llevan al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y una α -ramnosidasa, de forma que la α -ramnosidasa no tiene contacto directo con el flavonoide que contiene ramnosa y donde la α -ramnosidasa está

(i) encapsulada

o

(ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal.

Siempre que se cumplan las condiciones adecuadas (ambiente, pH, temperaturas, etc.), los enzimas α -ramnosidasa tienen normalmente la capacidad de escindir substratos que contienen un fragmento de ramnosa.

Sin embargo, en las composiciones de la presente invención el enzima se encuentra en un estado en que básicamente no puede llevar a cabo su función normal. Es solo tras la ingestión de las composiciones que el entorno del enzima cambia de tal manera que las nuevas condiciones (pH, temperatura, etc.) permiten que el enzima se active y, por lo tanto, escinda el fragmento de ramnosa del flavonoide.

Por lo tanto, en las composiciones o usos de la presente invención, la α -ramnosidasa no está en contacto directo con el flavonoide que contiene ramnosa. Solo tras la ingestión de la composición, la α -ramnosidasa es capaz de escindir el flavonoide que contiene ramnosa.

Esta actividad "retardada" de la α -ramnosidasa asegura que la escisión del flavonoide mediante la α -ramnosidasa solo se produzca tras la ingestión. Por lo tanto, solo en las condiciones del tracto gastrointestinal tiene lugar la actividad de la α -ramnosidasa.

Esto se puede conseguir de varias formas.

Por ejemplo, esto se puede lograr teniendo la α -ramnosidasa dentro de la composición bajo unas condiciones en que esté "inactiva", es decir, incapaz de escindir el fragmento de ramnosa del flavonoide. Una α -ramnosidasa inactiva es, por ejemplo, una α -ramnosidasa que ha sido tratada con un inhibidor de manera que solo pueda activarse cuando se encuentre en las condiciones del tracto gastrointestinal.

Como alternativa, las condiciones de la composición pueden ser tales que el enzima esté "inactivo", por ejemplo, a un valor alto de pH. Tras la ingestión, el bajo pH del tracto gastrointestinal proporcionará las condiciones favorables para que se active la α -ramnosidasa.

Según la presente invención, esto se puede conseguir separando en la composición la α -ramnosidasa del flavonoide. La α -ramnosidasa se separa de manera que no esté en contacto directo con el flavonoide.

La separación puede llevarse a cabo, por ejemplo, encapsulando la α -ramnosidasa por medios conocidos en el estado técnico. Así, el enzima puede encapsularse de forma que solo se libere en las condiciones del tracto gastrointestinal.

Alternativamente, cuando se encapsula la α -ramnosidasa en un microorganismo capaz de liberar α -ramnosidasa, la α -ramnosidasa no está en contacto directo con el flavonoide dentro de la composición. Esta "bioencapsulación" puede conseguirse mediante una cepa productora de α -ramnosidasa de un microorganismo mantenido en tales condiciones (actividad acuosa, etc.) que el microorganismo tenga una tasa metabólica baja o nula. Por lo tanto, en las condiciones reinantes en la composición (actividad acuosa, etc.) el microorganismo no está liberando el enzima. La α -ramnosidasa está "bioencapsulada" dentro de las paredes celulares del microorganismo.

El microorganismo productor de α -ramnosidasa que se emplea en las composiciones o en los métodos de la presente invención es preferiblemente una bacteria. El microorganismo se selecciona con mayor preferencia entre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, etc.

El microorganismo se elige sobre todo entre *Lactobacillus crispatus* (ATCC 33820), *Lactobacillus crispatus* (CNCM 1-3654), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014), *Lactobacillus plantarum* (CNCM 1-3653), *Enterococcus faecium* (ATCC 19434) o mezclas de ellos.

El microorganismo se encuentra preferiblemente en las composiciones de la presente invención en una proporción de 10^6 - 10^{10} ufc/g. Con mayor preferencia se encuentra en una proporción de 10^9 ufc/g.

El microorganismo capaz de producir la α -ramnosidasa puede estar asimismo encapsulado. La encapsulación de los microorganismos es un método bien conocido del especialista en la materia.

Los flavonoides empleados en la presente invención se pueden elegir entre cualquiera de los flavonoides que incluyen un fragmento de ramnosa. Cualquier flavonoide que lleve ramnosa se puede elegir del grupo formado por hesperidina, rutina, eriotricina, naringina, neohesperidina, diosmina, linarina, poncirina, prunina, etc. y de cualquier combinación posible de esta lista que contenga dos o más componentes de la misma. El flavonoide es preferiblemente hesperidina (fig. 1a). La hesperidina (fig. 1a) comprende un fragmento de rutinosa (ramnosa-glucosa). En presencia de un enzima α -ramnosidasa activo, el fragmento de ramnosa de la hesperidina se puede separar en cierta medida para producir hesperetina-7-glucósido (fig. 1b). A su vez la hesperetina-7-glucósido puede ser escindida por otros enzimas, p.ej. por enzimas glucosidasa existentes en el tracto gastrointestinal, para dar hesperetina (fig. 1c).

En la fig. 2 se puede ver, por un lado, que el nivel plasmático de hesperetina (fig. 1c) presenta un pico agudo poco después de la ingestión de hesperetina-7-glucosa (fig. 1b). Sin querer limitarse a la teoría, se cree que ello es debido a la presencia de enzimas que pueden escindir el fragmento de glucosa, facilitando la absorción de la hesperetina.

5 Por otro lado, el nivel plasmático de hesperetina resultante de la ingestión de hesperidina (fig. 1a) aparece solo más tarde y en menor medida. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que ello es debido a la presencia de enzimas capaces de escindir el fragmento de rutinosa de la hesperidina solo en una fase posterior del paso por el tracto gastrointestinal.

10 Por tanto las composiciones de la presente invención proporcionan ventajosamente un nivel plasmático de hesperetina que se mantiene durante un período de tiempo más largo (véase la fig. 2).

Además, este nivel plasmático de hesperetina sostenido también es proporcionado por composiciones que contienen una mezcla de hesperidina (fig. 1a) y hesperetin-7-glucósido (fig. 1b). En las composiciones, estos compuestos se encuentran preferiblemente en una relación de hesperidina a hesperetina-7-glucósido entre 70/30 y 50/50.

15 La cantidad de flavonoide en las composiciones de la presente invención corresponde a una proporción que varía de 0,01 mg hasta 1 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide. El flavonoide se encuentra preferiblemente en una proporción que varía desde 10 mg hasta 800 mg del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.

20 Por ejemplo, cuando en una composición de la presente invención se emplea hesperidina (fig. 1a), ésta se encuentra en una cantidad que proporcionará 0,01 mg hasta 1 g, preferiblemente 10 mg hasta 800 mg, de la correspondiente hesperetina (fig. 1c), lo cual es fácilmente calculable por un especialista en la materia.

25 En las composiciones de la presente invención, la α -ramnosidasa puede encontrarse en una cantidad suficiente para aportar un 10-50% de la aglicona flavonoide o de una forma de flavonoide glicosilado absorbible en las primeras fases de la digestión.

30 Por ejemplo, en caso de que el flavonoide sea hesperidina, la cantidad de α -ramnosidasa empleada es suficiente para proporcionar un 10-50% de hesperetina-7-glucósido (fig. 1b) o hesperetina (fig. 1c) en el tracto gastrointestinal superior (intestino delgado). Esto puede evaluarse fácilmente por métodos conocidos del estado técnico, tales como ensayos con el sistema TIM-1 del modelo TNO y confirmación *in vivo*.

Las composiciones de la presente invención se formulan preferiblemente para usar como composiciones nutricionales, farmacéuticas o cosméticas.

35 Por lo tanto las composiciones de la presente invención pueden ser secas, húmedas o semihúmedas. Por "secas" se entienden aquellas composiciones que tienen una actividad acuosa inferior a 0,6. Por "semihúmedas" se entienden las composiciones que tienen una actividad acuosa entre 0,6 y 0,9 y por "húmeda" se entiende una composición que tiene una actividad acuosa superior a 0,9.

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

45 Para ingestión hay muchas formas posibles de ejecución de composiciones orales y, en particular, de suplementos alimenticios. Se formulan según los métodos habituales de producción de tabletas recubiertas de azúcar, cápsulas de gelatina, geles, emulsiones, tabletas, cápsulas o soluciones. En concreto, los flavonoides que contienen ramnosa y la α -ramnosidasa o, en una forma de ejecución distinta, la hesperidina y la hesperetina-7-glucósido pueden incorporarse a cualquier otra forma de suplementos alimenticios o de alimentos enriquecidos, como por ejemplo barras alimenticias o polvos compactados o no compactados. Los polvos se pueden diluir con agua, en una bebida gaseosa, en productos lácteos o en productos derivados de la soja o se pueden incorporar a barras alimenticias.

50 Las composiciones pueden incluir los excipientes y componentes habituales, p.ej. componentes grasos y/o acuosos, agentes humectantes, espesantes, agentes conservantes, agentes texturizantes, saborizantes y/o de recubrimiento, antioxidantes, colorantes que son frecuentes en el campo de los productos alimentos.

Según otro aspecto de la presente invención, la α -ramnosidasa se puede emplear en una composición que incluya un flavonoide con contenido de ramnosa, en la cual la α -ramnosidasa no tenga contacto directo con el flavonoide, a fin de mejorar la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de dicho flavonoide, y donde la α -ramnosidasa esté

(i) encapsulada

o

(ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal. Por "composición" se entiende cualquiera de las descritas arriba según la presente invención.

65 La bioeficacia se define como la proporción del nutriente ingerido, convertido en una forma activa del mismo, que tiene

un efecto biológico significativo. Está estrechamente relacionada con la biodisponibilidad, que se define como el grado en que una sustancia es absorbida en la circulación sistémica. Al mejorar la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de un flavonoide, la presente invención ofrece la ventaja de una composición más efectiva con unos efectos más duraderos y sostenidos.

5 Por lo tanto, aquí también se describe un método para mantener y/o mejorar la biodisponibilidad de los flavonoides que contienen ramnosa, el cual incluye la etapa de preparar una composición como la descrita anteriormente.

10 Una comparación de los niveles plasmáticos tras la ingestión de hesperidina (fig. 1a) o tras la ingestión de hesperetina-7-glucósido (fig. 1c) muestra una diferencia notable con las composiciones de la presente invención. En efecto, tras la ingestión de las composiciones de la presente invención los niveles plasmáticos de hesperetina se mantienen durante un período de tiempo sostenido (fig. 2).

15 Por tanto, aquí también se describe un método para prolongar los niveles plasmáticos de los metabolitos de flavonoides que contienen ramnosa, tras la ingestión de dicho flavonoide, el cual incluye la administración oral de una composición como la descrita anteriormente.

20 En los métodos también aquí descritos, la α -ramnosidasa se puede proporcionar aparte de la composición que lleva el flavonoide con contenido de ramnosa. Así, por ejemplo, dicha α -ramnosidasa se puede suministrar en forma de una tableta, cápsula, etc. para ser ingerida al mismo tiempo que la composición que incluye el flavonoide. Como alternativa se puede suministrar, por ejemplo, en forma de un polvo para esparcir sobre la composición que lleva el flavonoide. El especialista podría prever fácilmente varias alternativas distintas.

25 En otro aspecto, las composiciones según la presente invención pueden usarse cosméticamente. Por "uso cosmético" se entiende un uso no terapéutico que puede mejorar el aspecto estético o la comodidad de la piel, del pelaje y/o del cabello de humanos o mascotas.

30 En este contexto, el uso cosmético puede incluir la prevención de los daños y/o la mejora de la piel, del pelaje y/o del cabello de humanos o mascotas. Dichos daños incluyen, en particular, los provocados por la radiación actínica y el envejecimiento de la piel, por ejemplo sequedad, pigmentación irregular (sobre todo pecas, lentigos, hiperpigmentación persistente), arrugas (sobre todo líneas superficiales finas y surcos profundos), pseudocicatrices estrelladas, elastosis, inelasticidad, comedones, hiperplasia sebácea, acrocordón y queratosis seborreica.

35 El uso cosmético también puede ser especialmente beneficioso para el cabello y el pelaje, mejorando por ejemplo la densidad del cabello o del pelaje, el diámetro de las fibras, el color, la untuosidad, el brillo, la producción de sebo, y puede contribuir a evitar la pérdida del cabello o del pelaje.

40 La presente invención también abarca usos terapéuticos tales como los de tipo dermatológico, por ejemplo. De hecho el empleo de α -ramnosidasa y de al menos un flavonoide con contenido de ramnosa - sin que la α -ramnosidasa tenga contacto directo con dicho flavonoide - en la preparación de composiciones para mejorar la salud de la piel cae bajo otro aspecto de la presente invención. Dichas composiciones también se pueden usar para prevenir las inflamaciones o para mejorar la salud ósea y/o cardiovascular. Por "composición" se entiende cualquier composición conforme a la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente.

45 En esta forma de ejecución las composiciones según la presente invención se pueden utilizar para tratar y/o prevenir los daños de la piel debidos, por ejemplo, a una situación de estrés, p.ej. de tipo químico, biológico o físico, provocado p.ej. por exposición a oxidantes o carcinógenos, exposición a bacterias, virus, hongos, lípidos procedentes de células y/o microbios del entorno, o exposición a radiación UV.

50 Estos daños también incluyen las queratosis actínicas, púrpura, angiomas cereza, el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, las quemaduras y/o ampollas de la piel, la hiperplasia epidérmica, inflamaciones, inmunosupresión y cánceres, p.ej. cánceres de piel no melánicos y melanomas, hipomelanositis guttata, telangiectasias, lagos venosos.

55 El efecto de las composiciones según la presente invención en la piel de humanos o mascotas se puede determinar por métodos convencionales, entre ellos: dosis eritemal mínima (DEM), colorimetría, pérdida de agua transepidérmica, reparación del ADN, medición de la producción de interleucinas y proteoglicanos o actividad de la colagenasa, función de barrera o renovación celular.

60 Por consiguiente, un método para mejorar la salud de la piel puede incluir la administración oral de una composición como la descrita anteriormente. Este método también es útil para mejorar la salud cardiovascular y ósea.

65 Se deduce que el concepto de la presente invención también es aplicable como terapia adyuvante de las medicaciones utilizadas en el momento. Como las composiciones de la presente invención son fácilmente administrables por vía oral junto con material alimenticio, se pueden suministrar alimentos clínicos especiales que contengan una gran proporción de las sustancias requeridas.

Además, el concepto de la presente invención también es extensible a aplicaciones tópicas de las composiciones que llevan un flavonoide con contenido de ramnosa y un enzima alfa-ramnosidasa.

- 5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos no limitantes descritos a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales

Hesperidinasa "Amano" conc. (A.MANO FARMACEUTICAL CO., LTD.)

Escisión de hesperidina mediante extractos bacterianos crudos *in vitro*

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

Los resultados demuestran que ambas cepas tienen actividad de α -ramnosidasa y β -glucosidasa y por lo tanto dividen la hesperidina en hesperetina-7-glucósido y aglicona en distinta medida, dependiendo de las condiciones de reacción. Los resultados sugieren que las bacterias se pueden usar para transformar parcialmente hesperidina en hesperetina-7-glucósido y aglicona *in situ*.

%		Recuento bacteriano	Hesperidina		Hesperetina-7-glucósido		aglicona		Pico (TR 1,42)	
			4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h
Control (-) (sin enzima)	pH 4		nd	95	nd	0	nd	0	nd	no
	pH 6		nd	95	nd	0	nd	0	nd	no
Control (+) pH 4 (hesperedinasa) pH 6	pH 4		0	0	92	93	0	0	0	sí
	pH 6		66	49	25	40	0	0	0	sí
L. acidophilus NCC 3010	pH 4	3,4 x 10 ⁹ /ml	18	5	28	18	26	42	18	24
	pH 6		26	10	6	5	13	27	50	56
L. plantarum NCC1313	pH 4	3,4 x 10 ⁹ /ml	12	8	5	4	62	66	17	13
	pH 6		9	0	5	0	25	33	59	64
Nd: no determinado										
TR: tiempo de retención (un pico que aparece a TR 1,42 revela un producto de degradación de hesperidina).										

Ejemplo 2

Se mezclan 250 mg de hesperidina con 10^7 - 10^9 ufc/g de bacterias que tienen actividad de alfa-ramnosidasa. La mezcla resultante se mezcla con un vehículo adecuado. Los vehículos se pueden elegir entre leche fermentada, yogur, queso fresco, leche cuajada, barras de confitería, copos o barras de cereales para el desayuno, bebidas, leches en polvo, producto a base de soja, productos fermentados no lácteos.

Figuras

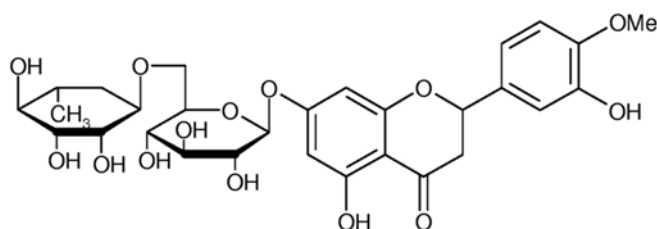


Figura 1a

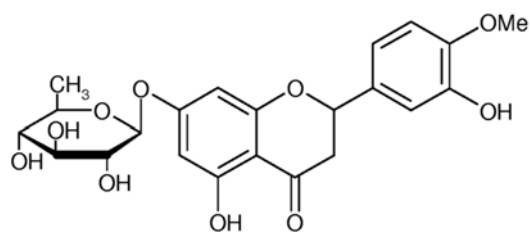


Figura 1b

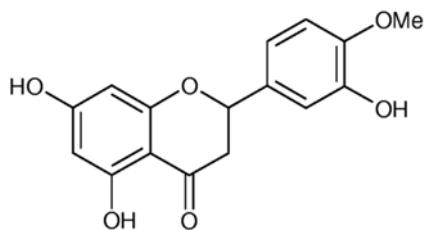


Figura 1c

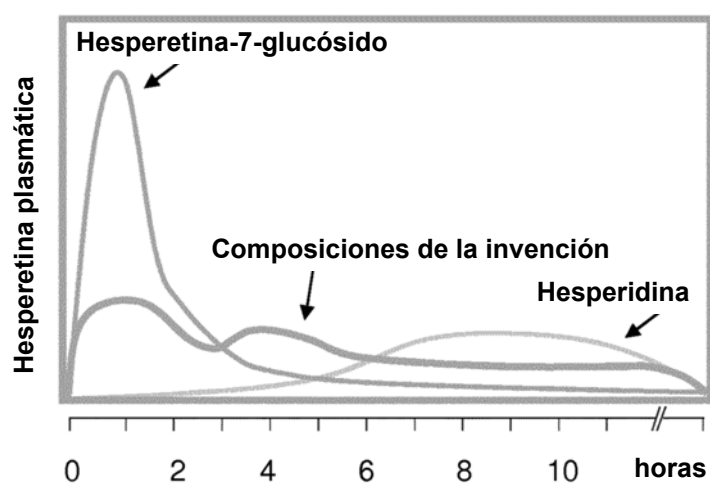


Figura 2

REIVINDICACIONES

1. Composición que lleva al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α -ramnosidasa, de forma que la α -ramnosidasa no tiene contacto directo con el flavonoide y está
 - 5 (i) encapsulada
o
 - (ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la cual la α -ramnosidasa está encapsulada en un microorganismo capaz de producir α -ramnosidasa.
3. Composición según la reivindicación 2, en la cual el microorganismo es una bacteria.
- 15 4. Composición según la reivindicación 3, en la cual el microorganismo está seleccionado entre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*.
5. Composición según una de las reivindicaciones 2 a 4, en la cual el microorganismo está seleccionado entre *Lactobacillus crispatus* ATCC33820, *Lactobacillus crispatus* CNCM I-3654, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, *Lactobacillus plantarum* CNCM I-3653, *Enterococcus faecium* ATCC 19434 o mezclas de ellos.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la cual el microorganismo se encuentra en una proporción de 10^6 - 10^{10} ufc/g.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la cual el microorganismo capaz de producir la α -ramnosidasa está encapsulado.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el flavonoide es hesperidina.
- 30 9. Composición según la reivindicación 8, en la cual la α -ramnosidasa se encuentra en cantidad suficiente para aportar un 10-50% de hesperetina-7-glucósido o de hesperetina en el tracto gastrointestinal superior.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la cual el flavonoide que contiene ramnosa está en una proporción correspondiente a 0,01 mg hasta 1 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.
- 35 11. Composición según la reivindicación 10, en la cual el flavonoide que contiene ramnosa está en una proporción correspondiente a 10 mg hasta 800 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, formulada para utilizarla como composición nutricional, farmacéutica o cosmética.
- 40 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, elegida entre composiciones líquidas, secas o semisecas tales como soluciones, aerosoles, polvos, tabletas, cápsulas, yogures, galletas, leche, bebidas, chocolate, helados, copos o barras de cereales para el desayuno, leches en polvo, productos de soja, productos fermentados no lácteos, suplementos nutricionales, suplementos alimenticios, comidas para mascotas, fórmulas infantiles.
- 45 14. Uso de α -ramnosidasa en una composición que lleva un flavonoide con contenido de ramnosa y en la cual la α -ramnosidasa no tiene contacto directo con el flavonoide, para mejorar la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de dicho flavonoide, y donde la α -ramnosidasa está
 - 50 (i) encapsulada
o
 - (ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal.
- 55 15. Uso de α -ramnosidasa y de al menos un flavonoide con contenido de ramnosa, de modo que la α -ramnosidasa no tiene contacto directo con el flavonoide, en la producción de una composición para mejorar la salud de la piel, y donde la α -ramnosidasa está
 - (i) encapsulada
o
 - 60 (ii) tratada con un inhibidor, de manera que la α -ramnosidasa solo puede ser activa en las condiciones del tracto gastrointestinal.
16. Uso según la reivindicación 15, de modo que la α -ramnosidasa está encapsulada en un microorganismo capaz de producir α -ramnosidasa.
- 65 17. Uso según la reivindicación 16, de modo que el microorganismo es una bacteria.

18. Uso según la reivindicación 17, de modo que el microorganismo se elige entre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*.
- 5 19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, de modo que el microorganismo está seleccionado entre *Lactobacillus crispatus* ATCC33820, *Lactobacillus crispatus* CNCM I-3654, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, *Lactobacillus plantarum* CNCM I-3653, *Enterococcus faecium* ATCC 19434 o mezclas de ellos.
- 10 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, de modo que el microorganismo se encuentra en una proporción de 10^6 - 10^{10} ufc/g.
21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, de modo que el microorganismo capaz de producir la α -ramnosidasa está encapsulado.
- 15 22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, de modo que el flavonoide es hesperidina.
23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, de modo que la α -ramnosidasa se encuentra en cantidad suficiente para aportar un 10-50% de hesperetina-7-glucósido o de hesperetina en el tracto gastrointestinal superior.
- 20 24. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, de modo que el flavonoide que contiene ramnosa está en una proporción correspondiente a 0,01 mg hasta 1 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.
- 25 25. Uso según la reivindicación 24, de modo que el flavonoide que contiene ramnosa está en una proporción correspondiente a 10 mg hasta 800 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.
26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, de modo que la composición está en forma de yogures, galletas, leche, bebidas, chocolate, helados, copos o barras de cereales para el desayuno, leches en polvo, productos a base de soja, productos fermentados no lácteos o suplementos nutricionales, suplementos alimenticios, comidas para mascotas, fórmulas infantiles.
- 30 27. Uso cosmético de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
28. Uso según la reivindicación 27 para prevenir los daños y/o mejorar la piel, el pelaje y/o el cabello de humanos o mascotas.
- 35

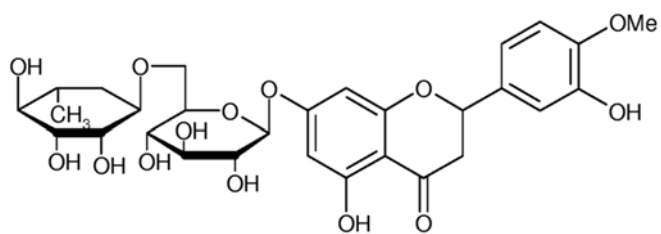


Figura 1a

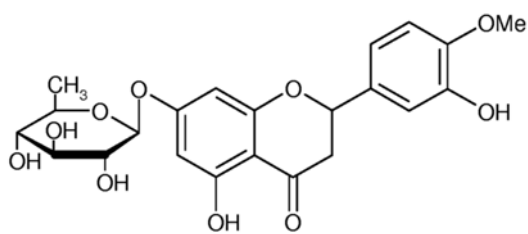


Figura 1b

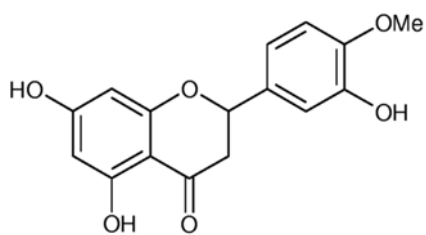


Figura 1c

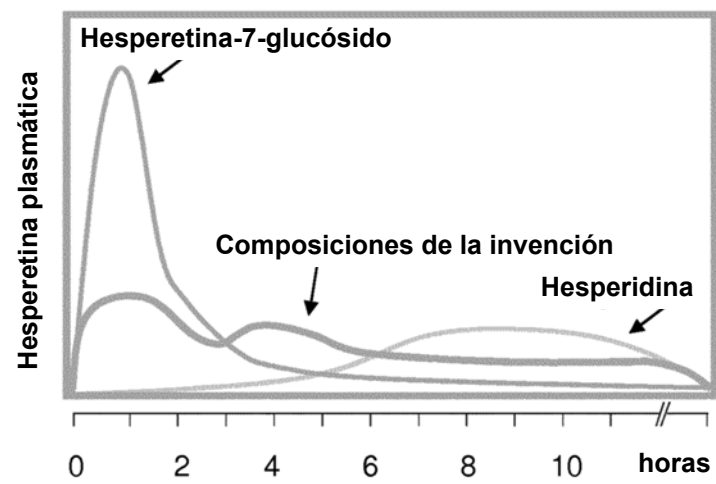


Figura 2