



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0718533-2 A2



(22) Data de Depósito: 06/11/2007
(43) Data da Publicação: 26/11/2013
(RPI 2238)

(51) *Int.Cl.*:
A61K 31/216
A61K 38/46
A61K 35/74

(54) Título: COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO ÁCIDO ROSMARÍNICO, USO DAS MESMAS, USO DE UMA ENZIMA HIDROLÍTICA OU UM MICRO-ORGANISMO CONTENDO OU PRODUZINDO A DITA ENZIMA E PROCESSO PARA O PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO QUE TEM UMA BIOEFICÁCIA AUMENTADA.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 06/11/2006 EP 06 023060.4,
12/12/2006 US 60/869,615

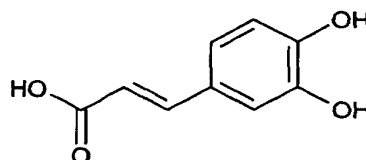
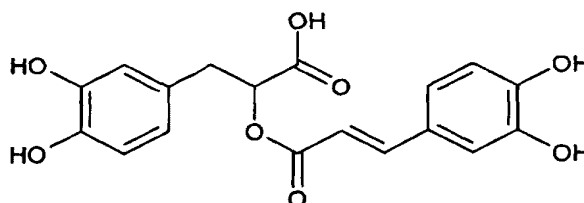
(73) Titular(es): L'oreal (L'oreal S.A.), Nestec S.A.

(72) Inventor(es): Isabelle Castiel, Nicolas Page, Rachid Bel-Rhlid, Thomas Raab, Vanessa Crespy

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007009602 de
06/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/055651 de
15/05/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO ÁCIDO ROSMARÍNICO, USO DAS MESMAS, USO DE UMA ENZIMA HIDROLÍTICA OU UM MICRO-ORGANISMO CONTENDO OU PRODUZINDO A DITA ENZIMA E PROCESSO PARA O PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO QUE TEM UMA BIOEFICÁCIA AUMENTADA"**.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se às composições compreendendo ácido rosmarínico ou extratos contendo ácido rosmarínico e ao uso de uma enzima hidrolítica ou de micro-organismos contendo ou capazes de produzir enzimas hidrolíticas nessas composições. A invenção também refere-se aos métodos para melhorar os efeitos biológicos das composições que contêm ácido rosmarínico e seus derivados.

Técnica Anterior

Ácido rosmarínico é um polifenol encontrado em um número de fontes naturais incluindo alecrim, orégano, manjerona, tomilho, hortelã-pimenta, confrei, salsa, erva cidreira, salva, hissopo, manjerição, lavanda etc. Essas plantas têm sido registradas como remédios herbários com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e hepatoprotetoras. Esses efeitos biológicos têm sido relacionados à presença de polifenóis, notadamente ácido rosmarínico, flavonoides, e flavanóis que foram identificados nas folhas de alecrim, por exemplo.

Não existe nenhum modo descrito na técnica quanto a como melhorar os efeitos biológicos de composições compreendendo ácido rosmarínico ou extratos de plantas compreendendo o dito ácido rosmarínico.

Objetivo da invenção

Dessa maneira ainda permanece uma necessidade de melhorar os efeitos biológicos de composições compreendendo ácido rosmarínico ou extratos de plantas que compreendem o dito ácido rosmarínico e derivados do mesmo.

Sumário da Invenção

Por isso, esse objetivo é resolvido pelas características das reivindicações independentes. As reivindicações dependentes adicionalmente desenvolvem a idéia central da invenção.

Dessa maneira, em um primeiro aspecto, a presente invenção

refere-se a uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo em combinação com uma enzima hidrolítica e/ou com um micro-organismo que contém ou produz a dita enzima.

5 Em um segundo aspecto, a invenção refere-se a uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo em combinação com um produto de hidrólise do mesmo.

Uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15 para uso no melhoramento, ou para prevenir danos para a pele, faz também parte da presente invenção.

10 Além disso, a invenção abrange o uso de cosmético de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

Em outro aspecto, a invenção refere-se ao uso de uma enzima hidrolítica, ou um micro-organismo que contém ou produz a dita enzima para hidrolisar o ácido rosmarínico.

15 O uso de uma enzima hidrolítica ou de um micro-organismo, que contém ou produz a dita enzima em uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou seus derivados para melhorar o efeito biológico da dita composição, enquadra-se em um aspecto adicional da invenção.

20 Adicionalmente, a invenção também provê um método de preparação de uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo tendo um efeito biológico aumentado compreendendo as etapas de:

a. Prover ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo,
b. Prover uma enzima hidrolítica ou um micro-organismo que
25 contém ou produz a dita enzima, e

c. Misturar o dito ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo e enzima hidrolítica ou micro-organismo que contém ou produz a dita enzima com ingredientes adicionais para produzir a dita composição, de tal maneira que a hidrólise do ácido rosmarínico ocorre na composição ou *in vivo*.

30 Finalmente, um método é provido para melhorar a saúde de um sujeito compreendendo a etapa de administrar uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 15.

Figuras

A presente invenção é ainda descrita daqui em diante com referência a algumas de suas modalidades mostradas nos desenhos que acompanham, em que:

- 5 - figura 1 ilustra a estrutura molecular do ácido rosmarínico,
- figura 2 ilustra a estrutura molecular do ácido cafeico,
- figura 3 ilustra a estrutura molecular do ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico,
- figura 4 é um gráfico mostrando a influência da quantidade de
- 10 enzima de esterase clorogenata sobre a hidrólise do ácido rosmarínico ((▲) 0,01 U/mg, (♦) 0,02 U/mg) e na formação do ácido cafeico ((□□) 0,01 U/mg, (•) 0,02 U/mg),
- figura 5 é um gráfico mostrando a influência do pH na formação
- 15 do ácido cafeico a partir do ácido rosmarínico, usando a enzima de esterase clorogenata em pH 5,0 (•), pH 6,0 (□□), pH 7,0 (▲), e pH 8,0 (♦),
- figura 6 é um gráfico mostrando o efeito da temperatura sobre
- a hidrólise do ácido rosmarínico (□□), e sobre a formação do ácido cafeico (•) a 30°C, 40°C, e 50°C usando 0,02 U de enzima por mg do ácido rosmarínico,
- 20 - figura 7 é um gráfico mostrando a influência da concentração
- de substrato sobre a taxa de hidrólise do ácido rosmarínico e o rendimento usando (•) 1mg, (♦) 2mg, (▲) 4 mg, e (□□) 6 mg do ácido rosmarínico e 0,02 unidade de enzima em pH 6,6 e 40°C,
- figura 8 é um gráfico mostrando o efeito biológico melhorado de
- 25 um extrato contendo ácido rosmarínico, depois da hidrólise (Naturex PE20 hidrolisado), comparado com um extrato compreendendo ácido rosmarínico (Naturex PE20).

Descrição Detalhada da Invenção

- A presente invenção refere-se às composições compreendendo
- 30 ácido rosmarínico e derivados do mesmo. As composições podem ser "composições alimentares" ou "composições tópicas". Por "composições alimentares" se quer dizer qualquer produto consumível que pode ser usado para

fins nutricionais, farmacêuticos e/ou cosméticos. Por "composições tópicas" se quer dizer qualquer composição que pode ser aplicada à pele, pelo, unhas ou cabelo de um sujeito para fins farmacêuticos e/ou cosméticos. Preferivelmente, as composições são composições alimentares.

5 O ácido rosmarínico (figura 1) e seus derivados são comumente encontrados em plantas tais como alecrim, orégano, manjerona, tomilho, hortelã-pimenta, confrei, salsa, erva cidreira, salva, hissopo, manjerição, lavanda, perila etc.

10 Por "derivados" de ácido rosmarínico se quer dizer qualquer composto compreendendo pelo menos uma porção de ácido rosmarínico. Esses incluem oligômeros, polímeros, glicosídeos de ácido rosmarínico etc.

O Ácido rosmarínico e seus derivados podem ser providos como compostos puros ou por várias ervas tais como perila (*Perilla frutescens* L.), salva (*Salvia officinalis* L.), menta (*Mentha arvensis* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), dulcamara chinesa (*Celastrus hindsii*) etc. Preferivelmente ele é provido por alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

15 Além do mais, a extração de plantas contendo uma fonte de ácido rosmarínico pode ser realizada usando métodos conhecidos na técnica. Na verdade, a composição da presente invenção preferivelmente compreende extratos de plantas compreendendo ácido rosmarínico e/ou seus derivados. Preferivelmente, os extratos estão presentes na composição em uma quantidade que varia de 0,01g a 20g em uma base de substância seca.

20 A presente invenção dessa maneira provê uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo em combinação com uma enzima hidrolítica (por exemplo esterase) ou um micro-organismo que contém ou produz uma enzima hidrolítica capaz de hidrolisar o ácido rosmarínico ou seus derivados.

25 Devido ao efeito hidrolítico da enzima sobre o ácido rosmarínico e/ou em seus derivados, a composição pode ainda compreender os produtos de hidrólise de ácido rosmarínico e/ou seus derivados com a dita enzima. Esses podem incluir ácido cafeico, ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico etc. e misturas dos mesmos.

As composições da presente invenção podem ser composições secas, úmidas ou semiúmidas. Por "secas" se quer dizer composições que têm uma atividade de água abaixo de 0,6. Por "semiúmidas" se quer dizer composições que têm uma atividade de água entre 0,6 e 0,9, e por "úmidas" se quer dizer composições que têm uma atividade de água acima de 0,9.

As composições podem compreender veículos alimentares ou farmacêuticos apropriados. Esses incluem leite, iogurte, queijo, leite fermentado, leite baseado em produtos fermentados, sorvetes, produtos baseados em cereais fermentados, pó baseado em leite, fórmulas para crianças e bebês, alimentos para animais, em particular animais domésticos, comprimidos ou pastilhas, suspensões bacterianas líquidas, suplemento oral em forma seca e suplemento oral em forma líquida.

Dessa maneira, a composição pode ser uma composição alimentar na forma de alimentos nutricionais completos e alimentos de substituição, bebidas, água mineral, sopas, suplementos alimentares e alimentos de substituição, soluções, atomizadores, pós, comprimidos, cápsulas, barras nutricionais, suspensões bacterianas líquidas, produtos de confeitaria, produtos baseados em leite ou em leite fermentado, iogurtes, pós baseados em leite, produtos de nutrição enteral, composições para crianças e/ou bebês, produtos baseados em cereais ou produtos baseados em cereal fermentado, produtos baseados em soja, sorvetes, chocolate, café, produtos de "culinária" tais como maionese, purê de tomate ou molhos de salada, alimentos para animais domésticos etc. Dessa maneira, a composição pode também ser destinada para animais.

Para ingestão, muitas modalidades de composições orais, e em particular de suplementos alimentares, são possíveis. Elas são formuladas por meio dos métodos usuais para produzir comprimidos revestidos de açúcar, cápsulas de gelatina, géis, emulsões, comprimidos, cápsulas ou soluções. Em particular, a composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou um derivado do mesmo em combinação com uma enzima hidrolítica, ou com um micro-organismo que contém ou produz a dita enzima, pode ser incorporada em quaisquer outras formas de suplementos alimentares ou de alimen-

tos enriquecidos, por exemplo barras alimentares, ou pós compactados ou não compactados. Os pós podem ser diluídos com água, em uma bebida efervescente, produtos de laticínios ou produtos derivados de soja, ou podem ser incorporados em barras alimentares.

5 Alternativamente, a composição pode ser uma composição tópica na forma de soluções aquosas, aquosas alcoólicas ou oleosas, de dispersões do tipo solução ou dispersões do tipo loção ou soro, de emulsões que têm uma consistência líquida ou semilíquida do tipo leite, obtidas pela dispersão de uma fase gordurosa em uma fase aquosa (O/A) ou vice-versa
10 (A/O), ou de suspensões ou emulsão que têm uma consistência mole, semimole ou sólida do tipo creme, gel aquoso ou gel de anidro, ou então de microemulsões, de microcápsulas, ou micropartículas ou de dispersões vesiculares do tipo iônico e/ou não-iônico.

As composições da invenção podem compreender os excipientes e constituintes usuais, por exemplo, constituintes graxos e/ou aquosos,
15 agente umidificantes, agentes de espessamento, agentes conservantes, agentes de textura, agentes flavorizantes e/ou de revestimento, antioxidantes, corantes que são usuais no domínio alimentar e/ou tópico.

Preferivelmente, a enzima hidrolítica presente na composição é
20 uma esterase.

O princípio subjacente da presente invenção é que certas enzimas hidrolíticas são capazes de converter o ácido rosmarínico (figura 1) em ácido cafeico (figura 2) e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico (figura 3) que estão mais prontamente biodisponíveis do que o ácido rosmarínico. Dessa maneira, a bioeficácia das composições compreendendo ácido rosmarínico, ou
25 extratos de plantas compreendendo ácido rosmarínico, é melhorada.

Por prover uma composição compreendendo a dita enzima hidrolítica, a presente invenção permite o processo de converter ácido rosmarínico em ácido cafeico e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico descrito acima para
30 ocorrer na própria substância alimentar, no produto para a própria aplicação tópica, ou em um estágio inicial do processo de digestão *in vivo*, ou mediante a aplicação tópica, dessa maneira aumentando a bioeficácia das compo-

sições compreendendo ácido rosmarínico e/ou seus derivados.

Dessa maneira, as composições da invenção contendo ácido rosmarínico e/ou seus derivados têm efeitos biológicos melhorados.

Alternativamente, ou em adição, a composição da presente invenção pode compreender um micro-organismo que contém ou produz tal enzima hidrolítica.

A quantidade de enzima ou micro-organismo presente na composição da invenção é de tal maneira que pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 50% de ácido rosmarínico (figura 1) podem ser hidrolisados em ácido cafeico (figura 2) e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico (figura 3). Isso pode ser facilmente determinado pela pessoa versada, através dos métodos conhecidos na técnica.

Dependendo da aplicação, a enzima hidrolítica pode estar presente na composição em uma quantidade que varia de 0,01 a 1000 U/g.

Quando o micro-organismo é usado na composição, ele está preferivelmente presente em uma quantidade que varia de 1×10^3 a 1×10^{12} cfu/g.

O micro-organismo usado na composição da invenção pode ser selecionado a partir de bactérias, leveduras ou fungos. Preferivelmente, o micro-organismo é um micro-organismo probiótico. Mais preferivelmente, ele é selecionado de *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium lactis* (CNCM I-3446) ou misturas dos mesmos.

Sob outro aspecto da invenção, uma composição compreendendo ácido rosmarínico ou extratos de plantas compreendendo ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo, em combinação com um produto de hidrólise do mesmo, é provida. Preferivelmente, o produto de hidrólise é obtível pela clivagem enzimática de ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo. Tal produto de hidrólise pode ser selecionado de ácido cafeico, ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico etc. e misturas dos mesmos.

As composições da invenção são particularmente úteis para melhorar e prevenir danos na pele. Na verdade, elas têm sido consideradas

particularmente úteis na inibição e expressão de metaloproteinase da matriz. Preferivelmente, a metaloproteinase da matriz é do tipo 1.

5 A Figura 8 mostra o efeito da hidrólise sobre um extrato, compreendendo ácido rosmarínico, na liberação de MMP1 constitutiva. Pode-se ver que, comparada a um controle, o ácido ferúlico, e para um extrato compreendendo ácido rosmarínico (não hidrolisado), pelo menos o ácido rosmarínico parcialmente hidrolisado tem um efeito considerável sobre a liberação do MMP1 constitutivo e que o torna particularmente útil para melhorar e/ou prevenir danos na pele.

10 De acordo com uma modalidade, a composição da invenção pode ser usada cosmeticamente. Nessa modalidade, as composições podem ser projetadas para consumo oral ou para aplicações tópicas.

Por "uso cosmético" se quer dizer um uso não terapêutico que pode melhorar o aspecto estético ou o conforto da pele, pelo e/ou cabelo de seres humanos ou de animais domésticos.

15 Neste contexto, o uso do cosmético pode incluir prevenção de danos e/ou melhoramento da pele, pelo e/ou cabelo de seres humanos ou de animais domésticos. Tais danos incluem em particular danos actínicos e de envelhecimento da pele tais como ressecamento, pigmentação irregular (notadamente aquisição de sardas, lentigos, hipomelanose manchada e hiperpigmentação persistente), enrugamento (notadamente linhas de superfície fina e sulcos profundos), pseudocicatrices radiadas, elastose, inelasticidade, telangiectasia, lagos venosos, comedones, hiperplasia sebácea, acrocórdon e queratose seborréica.

25 O uso de cosmético pode também ter benefícios particulares sobre o cabelo e o pelo, tais como uma densidade de cabelo e pelo, diâmetro de fibra, cor, oleosidade, brilho, produção de sebo, e pode ajudar a prevenir perda de cabelo ou de pelo.

30 Quando usada cosmeticamente, a composição da invenção pode assumir qualquer forma de composição alimentar descrita acima. Preferivelmente, ela está na forma de suplementos dietéticos, que podem ser em forma líquida ou seca, tais como soluções, atomizadores, comprimidos, cápsulas,

sulas, cápsulas gelatinosas, pastilhas, pós, géis, emulsões etc. Mais preferivelmente ela está na forma de uma cápsula.

Alternativamente, a composição pode assumir a forma de uma composição tópica que pode estar na forma de soluções aquosas, aquosas
5 alcoólicas ou oleosas, de dispersões do tipo solução, ou dispersões do tipo loção ou soro, de emulsões que têm uma consistência líquida ou semilíquida do tipo leite, obtida pela dispersão de uma fase oleosa em uma fase aquosa (O/A) ou vice-versa (A/O), ou de suspensões ou emulsões que têm uma consistência mole, semissólida ou sólida do tipo creme, gel aquoso ou gel de
10 anidro, ou então de microemulsões, de microcápsulas, ou micropartículas ou de dispersões vesiculares do tipo iônico e/ou não-iônico.

Essas composições são preparadas de acordo com os métodos usuais conhecidos da pessoa versada. Em uma modalidade preferida, essas composições tópicas são projetadas de tal maneira que a enzima e/ou o mi-
15 cro-organismo interage com o ácido rosmarínico somente mediante aplicação tópica.

Composições para aplicações tópicas podem em particular constituir cremes de limpeza, protetores, tratamento ou cuidados com a face, para as mãos, para os pés, para as principais dobras anatômicas ou para o
20 corpo (por exemplo cremes para o dia, cremes para noite, cremes para remover maquiagem, cremes de base, cremes para sol), produtos de maquiagem tais como bases fluidas, leites de remoção de maquiagem, leites protetores ou de cuidados para o corpo, leites para depois da exposição ao sol, loções, géis ou espumas para os cuidados com a pele, tais como loções de
25 limpeza e desinfecção, loções de proteção solar, loções de bronzamento artificial, composições para banho, composições de desodorantes contendo um agente bactericida, géis ou loções para depois de fazer a barba, cremes depilatórios, ou composições para picadas de insetos, sabonetes, tortas de limpeza, cremes, géis, emulsões ou musses, composições de aerossol para
30 o cabelo etc.

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de enzima hidrolítica ou de um micro-organismo contendo ou produzindo uma en-

zima hidrolítica para hidrolizar o ácido rosmarínico (figura 1). Com referência às figuras 4 a 7, a hidrólise do ácido rosmarínico em ácido cafeico (figura 2) e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico (figura 3) pode depender da quantidade de enzima usada, o pH e a temperatura em que a hidrólise é realizada e a
5 quantidade de ácido rosmarínico presente.

O uso de uma enzima hidrolítica ou um micro-organismo contendo ou produzindo tal enzima hidrolítica em uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou seus derivados para melhorar a bioeficácia da dita composição é dessa maneira provido pela presente invenção.

10 Quando um micro-organismo é usado para esse fim, ele é preferivelmente selecionado de bactérias, leveduras ou fungos. Mais preferivelmente ele é um micro-organismo probiótico. Ainda mais preferivelmente, ele é selecionado a partir de *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium lactis* (CNCM I-3446) ou mis-
15 turas dos mesmos.

De acordo com outra modalidade da presente invenção, um método de preparar uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou seus derivados que tem uma bioeficácia aumentada é fornecido.

O método compreende a primeira etapa de prover o ácido rosmarínico e/ou seus derivados. Isso pode ser provido por várias ervas tais como alecrim, orégano, manjerona, tomilho, perila, hortelã-pimenta, confrei, salsa, erva cidreira, salva, hissopo, manjeriço, lavanda etc. ou misturas dos mesmos, ou por extração de fontes naturais.

20 Preferivelmente, o ácido rosmarínico é provido em uma quantidade variando de 0,01 mg a 10 g ou uma base de substância seca.

Em segundo lugar, uma enzima hidrolítica ou um micro-organismo contendo ou produzindo a dita enzima hidrolítica é provido.

Quando a enzima é usada como tal, ela é preferivelmente provida em uma quantidade variando de 0,01 a 1000 U/g.

30 Se o micro-organismo é usado, ele é preferivelmente provido em uma quantidade variando de 1×10^3 até 1×10^{12} cfu/g. O micro-organismo pode ser selecionado a partir de bactérias, leveduras ou fungos. De acordo

com uma modalidade preferida, o micro-organismo é um probiótico. Mais preferivelmente, ele é selecionado de *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium lactis* (CNCM I-3446) ou misturas dos mesmos.

5 A terceira etapa do método então consiste em misturar o ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo e a enzima hidrolítica e/ou micro-organismo contendo ou produzindo a dita enzima com outros ingredientes para produzir a dita composição, de modo que a hidrólise do ácido rosmarínico ocorra na composição ou *in vivo*.

10 O processo de conversão do ácido rosmarínico em ácido cafeico e ácido 3,4-di-hidroxifenil-láctico descrito acima pode assim ocorrer tanto na matriz alimentar por ela mesma, no produto para aplicação tópica, ou no estágio primitivo do processo de digestão *in vivo* ou mediante a aplicação tópica, assim aumentando a bioeficácia das ditas composições que compreendem o ácido rosmarínico e/ou seus derivados.

15 Outros ingredientes podem incluir quaisquer ingredientes usados na produção de produtos alimentícios, de composições tópicas e ingredientes funcionais. Estes incluem carbo-hidratos, proteínas, lipídios, fibras, vitaminas, prebióticos, minerais, extratos de planta etc.

20 A composição resultante pode estar em qualquer forma tal como aquelas composições descritas acima.

25 A presente invenção ainda abrange um método para melhorar a saúde de um indivíduo, compreendendo a etapa de administrar uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15. A administração pode ser tópica ou oral.

30 A composição da invenção consequentemente pode agir como um antioxidante, como um anti-inflamatório e anti-hipertensivo. Além disso, ela também possui efeitos positivos na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, na prevenção da diabetes do tipo 2, e nas doenças degenerativas do cérebro.

Além disso, as composições de acordo com a presente invenção podem ser administradas para o tratamento e/ou prevenção dos danos da

pele os quais são, por exemplo, produzidos por uma situação de tensão, por exemplo, por meio de uma tensão química, biológica ou física, por exemplo, pela exposição a oxidantes ou carcinogênicos, exposição a bactérias, vírus, fungos, lipídios derivados de células circundantes e/ou micróbios, ou exposição à irradiação por UV.

Estes danos, além disso, compreendem ceratoses actínicas, púrpura, angioedema de cereja, carcinoma de célula basal e carcinoma de célula escamosa, queimadura de pele e/ou formação de bolhas, hiperplasia epidermal, inflamação, supressão imune, e câncer, por exemplo, cânceres de pele não-melanoma e melanoma.

O efeito das composições de acordo com a presente invenção, sobre a pele de seres humanos ou animais domésticos, pode ser medido pelo uso de métodos convencionais incluindo dose eritemal mínima (MED), colorimetria, perda de água transepidermal, reparo de DNA, medição das interleucinas e produção de proteoglicanos, ou atividade da collagenase, da função de barreira, ou renovação celular. A composição de acordo com a invenção é, portanto, útil na melhora e prevenção contra os danos da pele.

Será entendido que o conceito da presente invenção pode da mesma forma ser aplicado como na terapia adjuvante auxiliando as medicações atualmente usadas. Visto que as composições da presente invenção podem facilmente ser administradas oralmente com material alimentício, alimento clínico especial pode ser administrado contendo uma alta quantidade de substâncias objetivas.

A presente invenção é ainda ilustrada por meio dos exemplos não-limitativos descritos abaixo.

Exemplos

Exemplo 1

Cosmético para a administração oral

Uma composição na forma de uma cápsula dura tem a seguinte formulação:

Composto	mg por cápsula
Extrato de alecrim	500
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	5×10^8 cfu
Excipiente para o núcleo	
Celulose microcristalina	70
Encompress [®]	60
Estearato de magnésio	3
Sílica coloidal anidra	1
Agente de revestimento	
Goma laca	5
Talco	61
Sacarose	250
Polividona	6
Dióxido de titânio	0,3
Agente de coloração	5

A composição pode ser administrada ao indivíduo em uma quantidade de 2 a 3 cápsulas diariamente.

Exemplo 2

- 5 Uma receita de alimento foi preparada pela mistura do extrato de alecrim (ou ácido rosmarínico) com *Lactobacillus johnsonii* (La1, CNCM 1-1225) na proporção de 1×10^5 a 1×10^{12} cfu de bactérias a 1 g a 10 g do extrato de alecrim (ou ácido rosmarínico). A mistura resultante foi adicionada ou
- 10 misturada com qualquer veículo adequado, por exemplo, um leite fermentado, um iogurte, um queijo fresco, um leite coalhado, uma barra de confeito, flocos ou barras de cereal para café da manhã, uma bebida, leite em pó, produto à base de soja, produto fermentado não-leite ou um suplemento nutricional para nutrição clínica.

Exemplo 3

Clivagem de ácido rosmarínico por enzimas

Influência da quantidade de enzima

Testes foram realizados em tampão de fosfato (50 mM, pH 6,6) a 40°C usando quantidades diferentes de enzima (0,01 U, 0,02 U e 1 U de enzima/mg de ácido rosmarínico). Como mostrado na figura 4, a taxa de reação foi proporcional à quantidade de enzima e quando clorogenato esterase foi usado a 1 U/mg de substrato, ácido rosmarínico foi completamente transformado em ácido cafeico e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico após apenas 30 minutos de tempo de reação (dados não mostrados).

Influência do pH

A influência do pH sobre a hidrólise enzimática (0,02 U/mg) de ácido rosmarínico foi estudada. A figura 5 mostra a geração de ácido cafeico nos valores de pH de 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. No pH 8,0, ácido rosmarínico foi completamente transformado após 2 h de tempo de reação enquanto a taxa de reação foi muito lenta no pH 6,0 e nenhuma hidrólise foi observada no pH 5,0.

Influência da temperatura

Para estudar a influência da temperatura sobre a taxa de reação e sobre a estabilidade dos produtos, testes foram realizados no pH 6,6, no tampão de fosfato (50 mM), usando a enzima a 0,02 U/mg de substrato e a 30°C, 40°C e 50°C. Como mostrado na figura 6, nenhuma diferença significativa foi observada quando a reação ocorreu a 40°C ou 50°C, enquanto que a 30°C a taxa de reação foi muito mais lenta.

Influência da concentração do substrato

A influência da concentração do substrato sobre a taxa de reação e sobre o rendimento foi investigada a 40°C, pH 6,6 usando 0,02 unidade de enzima e 1 mg, 2 mg, 4 mg, ou 6 mg de ácido rosmarínico. A figura 7 mostra que a taxa de reação e o rendimento foram fortemente influenciados pela razão de enzima/substrato.

Consequentemente, mais do que 90% de ácido rosmarínico foram hidrolisados após 4 horas quando 1 mg de substrato foi usado enquanto

apenas 40% de hidrólise foram observados quando 6 mg de substrato foram usados sob as mesmas condições.

Exemplo 4

Clivagem de ácido rosmarínico com micro-organismos

5 1. Incubação com *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225)

A bactéria foi desenvolvida em meio de MRS por 16 horas a 37°C sob condições anaeróbicas. Após a centrifugação, os péletes de célula foram lavados 3 vezes com 10 ml de tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 8). As células (0,60 g) foram suspensas em 1 ml de tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 8) e ácido rosmarínico foi adicionado (5 mg/mL) e a mistura foi incubada a 45°C durante 24 horas. Uma alíquota foi retirada a cada ½ hora para estudo cinético. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram analisados por HPLC. Após 4 horas de incubação, todo o ácido rosmarínico foi transformado em ácido cafeico e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico.

15 2. Incubação com *Bifidobacterium lactis* (CNCM I-3446)

A bactéria foi desenvolvida em MRS + 0,05% de meio de cisteína por 16 horas a 37°C sob condições anaeróbicas. Após a centrifugação, os péletes de célula foram lavados 3 vezes com 10 ml de tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 8). As células (0,60 g) foram suspensas em 1 ml de tampão de fosfato de sódio (50 mM, pH 8) e ácido rosmarínico foi adicionado (5 mg/mL) e a mistura foi incubada a 45°C durante 24 horas. Uma alíquota foi retirada a cada ½ hora para estudo cinético. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram analisados por HPLC. Após 24 horas de incubação, mais do que 50% de ácido rosmarínico foram transformados em ácido cafeico e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico.

Exemplo 5

Condições de teste, dosagem de MMP-1 (metaloproteinase da matriz) (ELISA)

Tratamento e irradiação

30 As células do fibroblasto foram colocadas em um meio de cultivo em placas de 96 cavidades. Após o pré-cultivo por 24 horas, o meio foi recolhido com um meio contendo o produto a ser testado (ou nenhum produto

para a referência). Cada condição experimental foi realizada em triplicata (usando 3 cavidades de cultivo).

Após o cultivo por 24 horas na presença (ou ausência) do produto a ser testado, o meio de cultivo foi removido e recolocado por uma solução tampão (EBSS) e as células foram mantidas afastadas de qualquer fonte de luz.

No final da incubação, a solução de EBSS foi recolocada por um meio contendo o composto a ser testado e as placas foram colocadas a 37°C, 5% de CO₂.

Após um tratamento de 48 horas, o sobrenadante de cultura foi coletado para ELISA dosagem de MMP-1. A viabilidade da célula foi a seguir avaliada sobre uma camada da célula pela medição da redução de MTT por desidrogenases de células viáveis de acordo com procedimento padrão.

Quantificação de collagenase (MMP-1)

A dosagem de MMP-1 (collagenase intersticial humana) foi realizada por ELISA usando um kit "BIOTRACK MMP-1 humana, sistema ELISA, Amersham RPN2610", de acordo com as instruções do fornecedor.

Processamento dos dados

Os dados de contagem foram transferidos e processados com o programa PRISM (Graf Pad Software). As comparações entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) usando o teste de comparação múltipla Dunnett.

A tabela abaixo mostra a liberação de MMP-1 constitutiva pelos fibroblastos. * mostra diferenças significativas com respeito à referência (p<0,01). Naturex é um extrato natural comercialmente disponível compreendendo ácido rosmarínico.

O Naturex hidrolisado é obtido pelo tratamento do extrato natural compreendendo ácido rosmarínico com uma cepa probiótica de *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225). Ácido rosmarínico foi pelo menos parcialmente transformado em ácido cafeico e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico durante a incubação.

		% de referência
Referência 1		100
Naturex PE 20 Controle	0,01 mg/ml	99
N PE20 C	0,001 mg/ml	93
Naturex PE 20 hidrolisado N	0,01 mg/ml	54*
PE20 H	0,001 mg/ml	73

Os resultados mostrados na tabela acima evidenciam os benefícios da pele providos pelo ácido rosmarínico pelo menos parcialmente hidrolisado em comparação ao ácido rosmarínico não hidrolisado. Mais particularmente, ele mostra o efeito inibitório das composições da invenção sobre a expressão de MMP-1.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo em combinação com um micro-organismo contendo ou produzindo uma enzima hidrolítica, em que o micro-organismo é um probiótico.
5
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende os produtos de hidrólise do ácido rosmarínico e/ou seus derivados com a dita enzima.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a enzima é uma esterase.
10
4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a enzima é capaz de hidrolisar o ácido rosmarínico em ácido cafeico e ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico.
5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o micro-organismo é selecionado dentre bactérias, leveduras ou fungos.
15
6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o micro-organismo probiótico é selecionado dentre *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium lactis* (CNCM I-3446) ou misturas dos mesmos.
20
7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que é formulada para o uso como um produto nutricional, farmacêutico ou cosmético.
8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a dita composição é uma composição alimentícia.
25
9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a composição alimentícia está na forma de alimentos nutricionais completos, bebidas, águas minerais, sopas, suplementos alimentícios e alimentos de reposição, soluções, sprays, pós, comprimidos, cápsulas, barras nutricionais, suspensões bacterianas líquidas, produtos de
30

confeito, à base de leite ou à base de leite fermentado, iogurtes, pós à base de leite, produtos de nutrição enteral, composições para crianças e/ou lactantes, produtos à base de cereal ou produtos à base de cereal fermentados, produtos à base de soja, sorvetes, chocolate, café, produtos de "culinária" tais como maionese, purê de tomate ou molhos para salada, alimento para animais de estimação etc.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a dita composição é uma composição tópica.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a composição está na forma de soluções aquosas, alcoólicas aquosas ou oleosas, de dispersões do tipo solução ou dispersões do tipo loção ou soro, de emulsões que têm uma consistência líquida ou semilíquida do tipo leite, obtidas pela dispersão de uma fase graxa em uma fase aquosa (O/A) ou vice-versa (A/O), ou de suspensões ou emulsão que têm uma consistência macia, semissólida ou sólida do tipo creme, gel aquoso ou gel anidro ou outros tipos de microemulsões, de microcápsulas, ou micropartículas ou de dispersões vesiculares de tipo iônico e/ou não-iônico.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de ser para uso na melhora e na prevenção contra danos à pele.

13. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de ser um uso cosmético.

14. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de ser para inibir a expressão de metaloproteinase da matriz.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a metaloproteinase da matriz é do tipo 1.

16. Uso de uma enzima hidrolítica ou um micro-organismo contendo ou produzindo a dita enzima em uma composição compreendendo ácido rosmarínico e/ou seus derivados, caracterizado pelo fato de ser para a melhora da bioeficácia da dita composição.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma esterase.

18. Uso de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo é selecionado dentre bactérias, leveduras, ou fungos.

19. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo é um probiótico.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o probiótico é selecionado dentre *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium lactis* (CNCM I-3446) ou misturas dos mesmos.

21. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 20, caracterizado pelo fato de que a composição é uma composição alimentícia na forma de alimentos nutricionais completos, bebidas, águas minerais, sopas, suplementos alimentícios e alimentos de reposição, soluções, sprays, pós, comprimidos, cápsulas, barras nutricionais, suspensões bacterianas líquidas, produtos de confeito, à base de leite ou à base de leite fermentado, iogurtes, pós à base de leite, produtos de nutrição enteral, composições para crianças e/ou lactantes, produtos à base de cereal ou produtos à base de cereal fermentados, produtos à base de soja, sorvetes, chocolate, café, produtos de "culinária" tais como maionese, purê de tomate ou molhos para salada, alimento para animais de estimação etc.

22. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 21, caracterizado pelo fato de que a composição é uma composição tópica na forma de soluções aquosas, alcoólicas aquosas ou oleosas, de dispersões do tipo solução ou dispersões do tipo loção ou soro, de emulsões que têm uma consistência líquida ou semilíquida do tipo leite, obtidas pela dispersão de uma fase graxa em uma fase aquosa (O/A) ou vice-versa (A/O), ou de suspensões ou emulsão que têm uma consistência macia, semissólida ou sólida do tipo creme, gel aquoso ou gel anidro ou outros tipos de microemulsões, de microcápsulas, ou micropartículas ou de dispersões vesiculares de tipo iônico e/ou não-iônico.

23. Processo para o preparo de uma composição que tem uma bioeficácia aumentada, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- 5 a. fornecimento de um extrato de planta compreendendo ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo,
 - b. fornecimento de uma enzima hidrolítica ou um micro-organismo contendo ou produzindo a dita enzima, e
 - c. mistura do dito ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo e enzima hidrolítica ou micro-organismo contendo ou produzindo a dita enzima
- 10 com outros ingredientes para produzir a dita composição, tal que a hidrólise do ácido rosmarínico ocorre na composição ou *in vivo*.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o ácido rosmarínico e/ou derivados do mesmo são fornecidos por várias ervas tais como alecrim, orégano, manjerona, tomilho, perila, hortelã-pimenta, confrei, salsa, erva cidreira, salva, hissopo, manjerição, al-
15 fazema, pela extração das fontes naturais ou misturas dos mesmos.

25. Processo de acordo com a reivindicação 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma esterase.

26. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações
20 23 a 25, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo é selecionado dentre bactérias, leveduras, ou fungos.

27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo é um probiótico.

28. Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado
25 pelo fato de que o micro-organismo probiótico é selecionado dentre *Lactobacillus johnsonii* (CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (ATCC BAA-999), *Bifidobacterium lactis* (CNCM I-3446) ou misturas dos mesmos.

29. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 28, caracterizado pelo fato de que o ácido rosmarínico é hidrolisado em
30 ácido cafeico e/ou ácido 3,4-di-hidróxi fenil-láctico.

30. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 29, caracterizado pelo fato de que os outros ingredientes são selecio-

nados dentre carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, prebióticos, minerais, extratos de planta, fibras, excipientes, flavorizantes.

31. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 30, caracterizado pelo fato de que a composição está na forma de uma
5 composição alimentícia tal como alimentos nutricionais completos, bebidas, águas minerais, sopas, suplementos alimentícios e alimentos de reposição, soluções, sprays, pós, comprimidos, cápsulas, barras nutricionais, suspensões bacterianas líquidas, produtos de confeito, à base de leite ou à base de leite fermentado, iogurtes, pós à base de leite, produtos de nutrição enteral,
10 composições para crianças e/ou lactantes, produtos à base de cereal ou produtos à base de cereal fermentados, produtos à base de soja, sorvetes, chocolate, café, produtos de "culinária" tais como maionese, purê de tomate ou molhos para salada, alimento para animais de estimação ou na forma de uma composição tópica tal como soluções aquosas, alcoólicas aquosas ou
15 oleosas, de disperses do tipo solução ou dispersões do tipo loção ou soro, de emulsões que têm uma consistência líquida ou semilíquida do tipo leite, obtidas pela dispersão de uma fase graxa em uma fase aquosa (O/A) ou vice-versa (A/O), ou de suspensões ou emulsão que têm uma consistência macia, semissólida ou sólida do tipo creme, gel aquoso ou gel anidro ou outros tipos de microemulsões, de microcápsulas, ou micropartículas ou de
20 dispersões vesiculares de tipo iônico e/ou não-iônico.

32. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma formulação para a melhora da saúde de um indivíduo.

FIG. 1

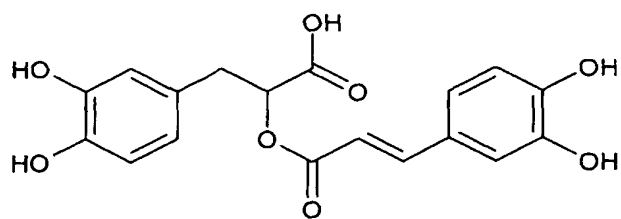


FIG. 2

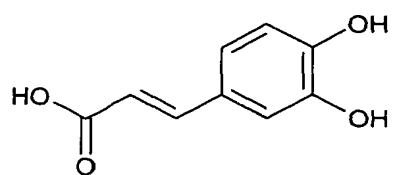


FIG. 3

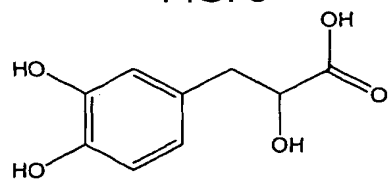


FIG. 4

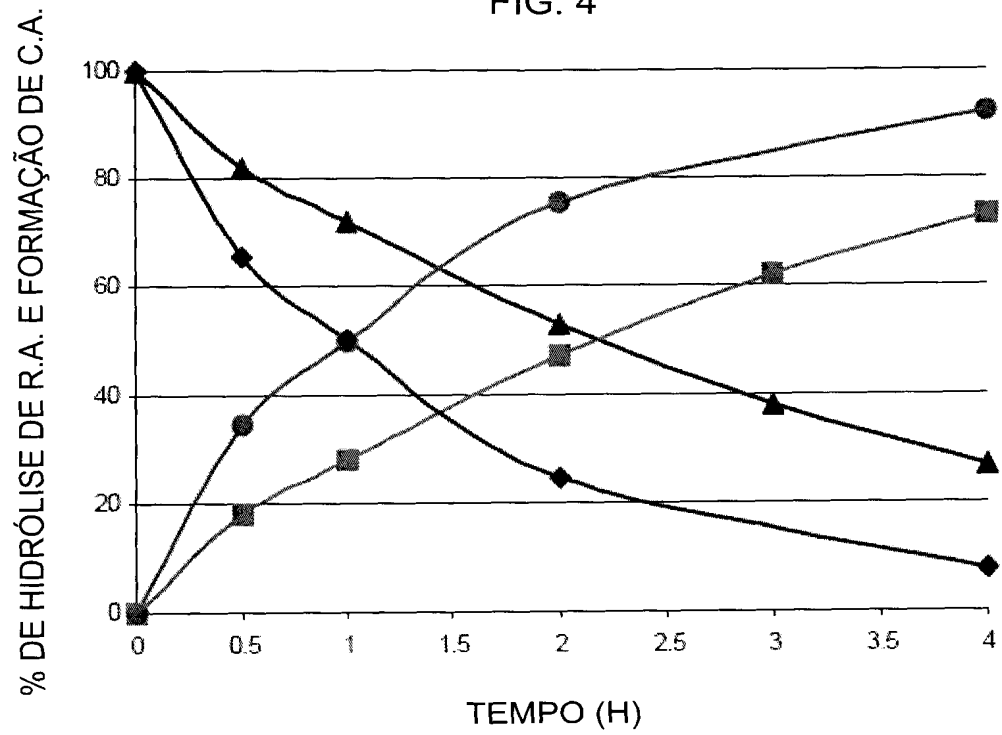


FIG. 5

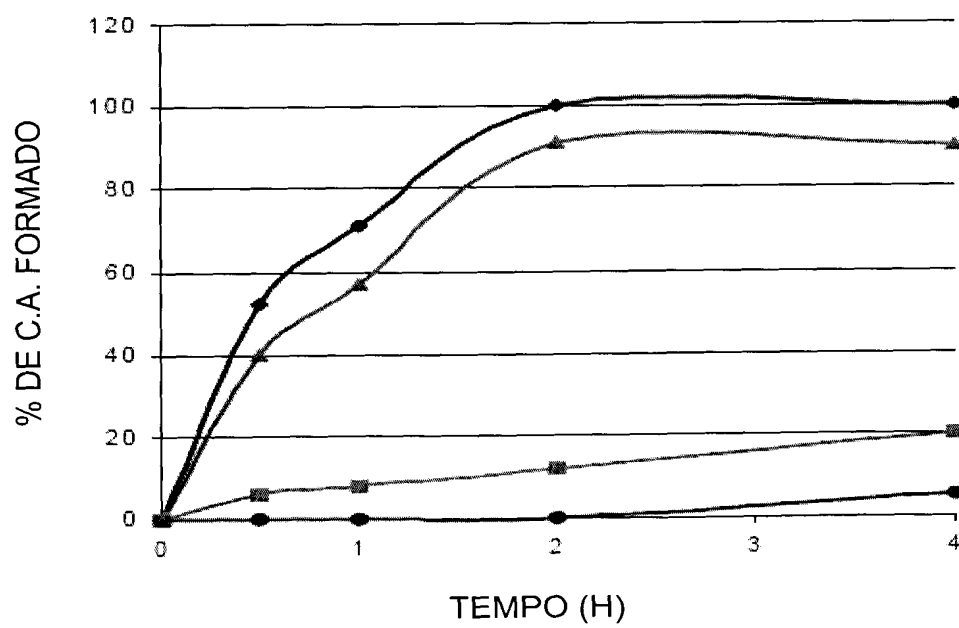


FIG. 6

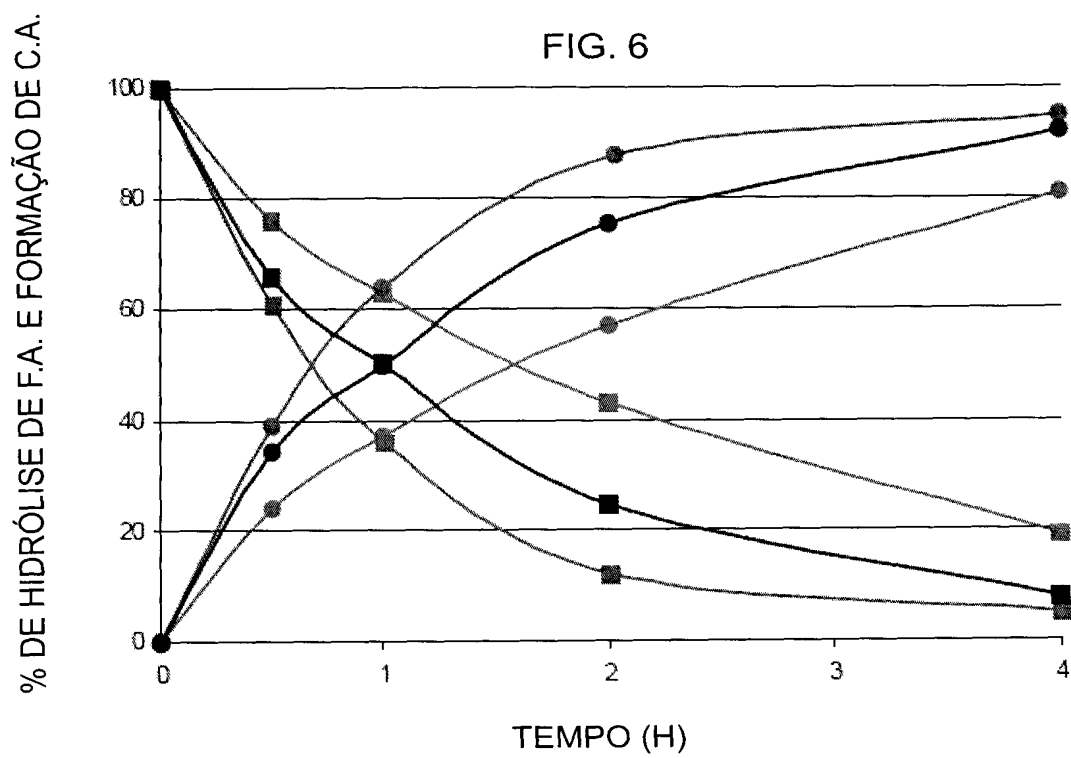


FIG. 7

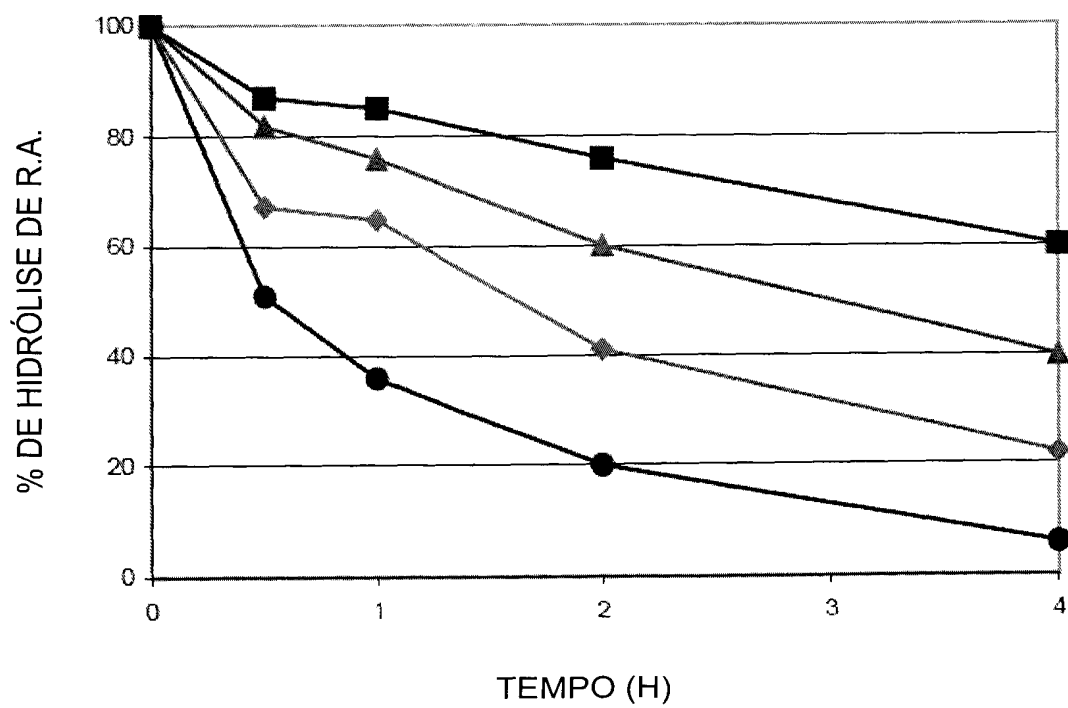
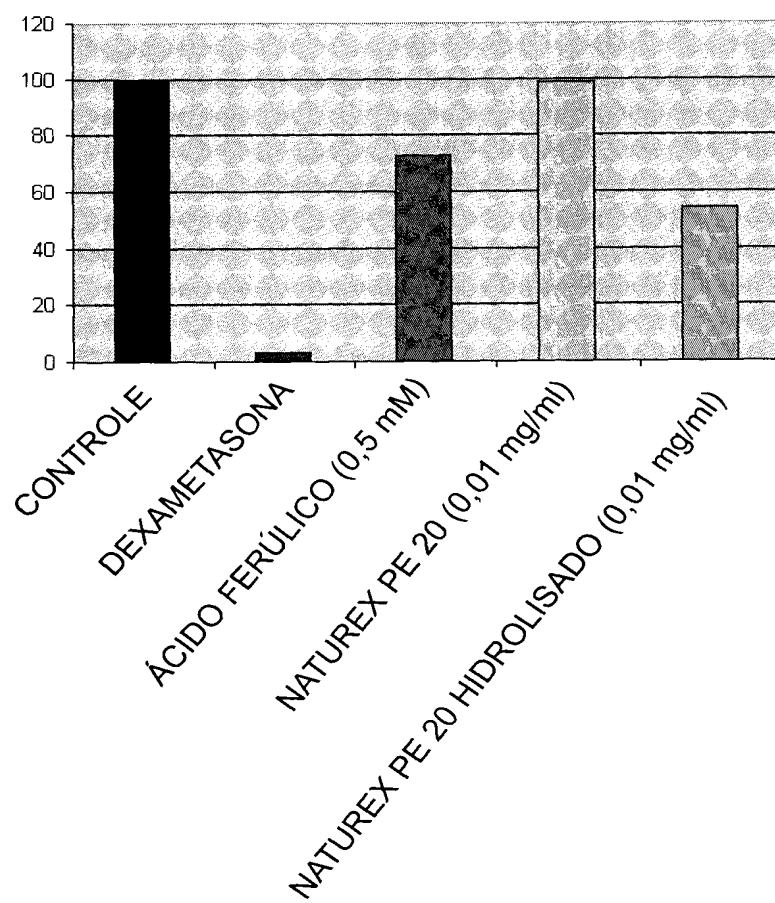


FIG. 8

LIBERAÇÃO DE MMP1 CONSTITUTIVO



RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO ÁCIDO ROSMARÍNICO, USO DAS MESMAS, USO DE UMA ENZIMA HIDROLÍTICA OU UM MICRO-ORGANISMO CONTENDO OU PRODUZINDO A DITA ENZIMA E PROCESSO PARA O PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO QUE TEM UMA BIOEFICÁCIA AUMENTADA"**.

A presente invenção refere-se às composições, que compreendem o ácido rosmarínico e/ou seus derivados e ao uso de uma enzima hidrolítica ou de um micro-organismo contendo ou produzindo enzimas hidrolíticas nessas composições. A invenção também pertence aos métodos para melhorar os efeitos biológicos dos ditos extratos de alecrim.