



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 28668 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 36/48; A61P 9/00**
(43) Date de publication : **01.06.2007**

-
- (21) N° Dépôt : **29537**
(22) Date de Dépôt : **15.12.2006**
(30) Données de Priorité : **23.06.2004 ES P 200401626**
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/EP2005/052877 21.06.2005**
(71) Demandeur(s) : **INVESTIGACION Y NUTRICION, S.L., VICENTE MUZAS, 8 E-28023 MADRID (ES)**
(72) Inventeur(s) : **RUIZ-ROSO CALVO DE MORA, Baltasar ; REQUEJO MARCOS, Ana María ; PEREZ-OLLEROS CONDE, Lourdes ; HOLGUIN HUESO, José Antonio**
(74) Mandataire : **ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)**

(54) Titre : **PRODUIT D'ORIGINE VEGETALE COMPRENANT DES PROANTHOCYANIDINES ET SON PROCEDE DE PREPARATION**

- (57) Abrégé : Produit d'origine végétale comprenant des proanthocyanidines et son procédé de préparation Le produit d'origine végétale ayant un pourcentage élevé de proanthocyanidines avec un poids moléculaire supérieur à 6 000 daltons, un pourcentage très élevé desdites proanthocyanidines ayant un poids moléculaire supérieur à 30 000 daltons, ce qui produit un grand effet hypocholestérolémiant à des doses acceptables pour la consommation humaine et peu d'effets anti-nutritionnels et astringents. Le produit d'origine végétale peut être présenté comme un médicament, une composition pharmaceutique, un complément diététique ou un produit alimentaire. Un procédé industriel est fourni pour sa préparation à partir des dicotylédones.

RESUME

Produit d'origine végétale comprenant des proanthocyanidines et son procédé de préparation

5 Le produit d'origine végétale ayant un pourcentage élevé de proanthocyanidines avec un poids moléculaire supérieur à 6 000 daltons, un pourcentage très élevé desdites proanthocyanidines ayant un poids moléculaire supérieur à 30 000 daltons, ce qui produit un grand effet
10 hypocholestérolémiant à des doses acceptables pour la consommation humaine et peu d'effets anti-nutritionnels et astringents. Le produit d'origine végétale peut être présenté comme un médicament, une composition pharmaceutique, un complément diététique ou un produit alimentaire. Un procédé industriel est fourni pour sa préparation à partir des dicotylédones.

PRODUIT D'ORIGINE VEGETALE COMPRENANT DES
PROANTHOCYANDINES ET SON PROCEDE DE PREPARATION

5 La présente invention se rapporte au domaine des industries alimentaires, pharmaceutiques et diététiques, en particulier aux produits liés au contrôle des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.

L'ART ANTERIEUR

10 Le niveau élevé du cholestérol dans le sang est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Les différentes études ont démontré que les populations qui consomment des régimes riches en fibres ont des quantités inférieures de cholestérol et de LDL dans le sang en comparaison aux
15 "Effect of hydroxypropylmethylcellulose on serum lipids in subjects with mild-to-moderate primary hypercholesterolemia", J. Am Col Card, 1998, vol. 31(2) Suppl. A:319A). Les effets bienfaits des fibres sont également connus pour la protection de l'intégrité de la barrière intestinale et pour la prévention du cancer du côlon.

20 Néanmoins, de nos jours, l'application thérapeutique des suppléments diététiques de fibres disponibles sur le marché est très problématique, principalement en raison du fait que ces fibres naturelles sont des mélanges de substances avec une composition chimique très variable et hétérogène
25 ayant la seule propriété commune qu'elles sont des composants alimentaires qui ne sont pas attaquées par les enzymes digestives humaines. C'est la raison pour laquelle il est difficile de définir leurs ingrédients actifs et de mesurer leur dose.

30 Les fibres diététiques contiennent des composés pharmaceutiquement actifs, mais elles contiennent principalement des produits avec peu ou pas d'activité, telles que les celluloses ou les hémicelluloses. Les composants minoritaires de la fibre diététique sont des polyphénols. Le terme polyphénol comporte un
35 grand nombre de métabolites secondaires des légumes, qui sont structurellement caractérisées par des anneaux aromatiques avec des groupes d'hydroxyle. Dans les plantes, les polyphénols peuvent être trouvés libres ou associés avec des composants de la paroi cellulaire. Cette localisation ainsi que leur poids moléculaire, permet la distinction entre les polyphénols solubles et insolubles. Les polyphénols insolubles disposent d'un
40 poids moléculaire élevé et ont des effets bienfaits sur la santé indiqués ci-dessus.

45 Néanmoins, les composés polyphénoliques insolubles existent en très petite quantité dans la fibre des légumes les plus communément consommées ou dans des suppléments diététiques de fibre commerciaux. En outre, la plupart de ces polyphénols insolubles ne sont pas utilisables en leur état normal dans les doses nécessaires pour un traitement chronique des maladies dégénératives parce qu'ils ont un effet astringent et anti-nutritionnel fort, en

raison de leur activité d'inhibition des enzymes digestives en formant des complexes avec des protéines.

5 L'une des fibres diététiques ayant un contenu élevé de polyphénols est la fibre de caroube, de fruit de caroubier (Ceratonia Siliqua). La première fibre commerciale avec un contenu élevé de polyphénols est celle appelée la "fibre de caroube", de C.G.A. S.A (voir. ES 2.060.543). Une autre fibre de caroube est décrite dans le document du brevet ES 2.204.301. Les deux fibres
10 disposent d'une teneur en polyphénols d'approximativement 50% du poids sec. Ces fibres réduisent les niveaux de cholestérol chez les rats mais l'extrapolation aux humains des doses utilisées dans les études avec les animaux signifierait des quantités entre 25 et 50 g/jour, qui sont des doses très élevées pour un usage thérapeutique.

15 Une expérience a été mise en pratique pour augmenter le contenu de polyphénols insolubles dans une fibre diététique. L'exemple le plus exceptionnel est une fibre de caroube contenant près de 90% de polyphénols insolubles qui ont été thermiquement modifiés afin d'éliminer leurs effets astringents et anti-nutritionnels (voir. ES 2.187.356).
20

RESUME DE L'INVENTION

Il est souhaitable de fournir aux fibres diététiques un pourcentage élevé de polyphénols insolubles en vue de produire un effet hypocholestérolémiant
25 maximum aux doses acceptables pour la consommation humaine et avec des effets astringents et anti-nutritionnels inférieurs. Il est également souhaitable de fournir des procédés industriellement viables pour sa préparation.

30 Ainsi, l'invention fournit un nouveau produit à un pourcentage élevé de polyphénols avec un poids moléculaire élevé. L'invention fournit également des procédés industriels pour sa préparation.

35 Dans un premier aspect, l'invention fournit un produit d'origine végétale qui comporte 65 à 97 % en poids de proanthocyanidines avec un poids moléculaire supérieur à 6 000 daltons, plus de 50 % de poids desdites proanthocyanidines ayant un poids moléculaire supérieur à 30 000 daltons. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le pourcentage en poids des proanthocyanidines ayant un poids moléculaire supérieur à 6 000 daltons est de 90 à 97%. En particulier, le pourcentage en poids des
40 proanthocyanidines ayant un poids moléculaire supérieur à 30 000 daltons par rapport aux proanthocyanidines ayant un poids moléculaire supérieur à 6 000 daltons dépasse 60%.

45 Bien qu'il y ait quelques différences, dans cette description le terme proanthocyanidines est considéré comme étant un synonyme du terme tannin condensé, étant tous les deux des dérivés des flavonoïdes chimiquement polymérisés, principalement de flavan-3-ol. Puis, elles sont un type de polyphénols à poids moléculaire élevé.

5 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, avec l'intention de réduire des effets astringents et anti-nutritionnels possibles, le produit d'origine végétale indiqué ci-dessus comporte en sus de 0 à 2% du poids, et en particulier de 0 à 1%, de polyphénols froids solubles dans l'eau.

10 La composition du produit d'origine végétale, selon la variété végétale utilisée et les conditions spécifiques du procédé de préparation est ainsi :

- Humidité : de 0 à 10%
- 10 - Minéraux : de 2 à 10%
- Proanthocyanidines ayant un poids moléculaire supérieur à 6 000 : de 65 à 97% (proanthocyanidines avec un poids moléculaire supérieur à 30 000 : plus de 50% desdites proanthocyanidines)
- Polyphénols solubles dans l'eau : de 0 à 2%.
- 15 - Celluloses et hémicelluloses : de 0 à 5%.
- Lignine : de 0 à 10%
- Oligosaccharides : de 0 à 5%
- Protéines : de 0 à 5%

20 Le produit d'origine végétale de la présente invention est une poudre amorphe brune. Il est à peine soluble dans l'eau et en alcools à faible poids moléculaire à la température ambiante. La solubilité augmente lorsque la température est près du point d'ébullition du dissolvant ou du mélange de dissolvants. Leurs solutions donnent une réaction positive des polyphénols
25 avec le réactif de Foline-Ciocalteau et une précipitation avec des sels de plomb. Le produit d'origine végétale de l'invention est un produit principalement non digestible et non absorbable dans le tube intestinal.

30 En raison de la structure chimique des proanthocyanidines présentes dans le produit de l'invention, elles produisent une interaction à type hydrophobe avec le cholestérol et les sels de bile, qui de facto, sont éliminés par les résidus à l'instar des complexes avec lesdites proanthocyanidines. Par conséquent, le cycle enterohépatique du cholestérol et des sels de bile est interrompu et
35 ainsi, le cholestérol diminue dans l'organisme. En raison de l'enrichissement des proanthocyanidines à poids élevé, le produit d'origine végétale de l'invention produit un effet hypocholestérolémiant maximum aux doses acceptables pour la consommation humaine, utilisable sous une forme pharmaceutique, et avec des effets astringents et anti-nutritionnels inférieurs.

40 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le produit est obtenu à partir des dicotylédones. Il peut être obtenu à partir de toute plante ou à partir de ses parties, y compris des fruits drupes et de préférence séchés. Les plantes et leurs fruits sont rassemblés drupes, généralement à la fin de l'été et sont laissés sécher dans l'ombre à une température ambiante et dans des
45 conditions d'humidité relativement inférieure. Les exemples des variétés végétales appropriées pour utilisation dans la préparation du produit de l'invention sont luzernes (Medicago sativa), le panicaut champêtre (Eryngium campestre), l'écorce du chêne vert (Quercus ilex), le grenadier (Punica

granatum) et le quebracho (Aspidosperma quebracho-bianco). Les exemples des fruits qui peuvent être utilisés sont le noyer du caroube (Silqua de Ceratonia), le fruit des noix (Juglans regia), l'olive (Olea europea), la myrtille (Vaccinium myrtillus), la grenade (Punica granatum) et la pomme (5 Pyrus malus). De préférence, le produit de l'invention est obtenu à partir de grenade ou de la pulpe de caroube.

Dans un deuxième aspect, l'invention fournit un procédé de préparation du produit d'origine végétale décrit ci-dessus, comportant les étapes de : (a) 10 effectuer un lavage du matériel végétale écrasé à l'aide d'un liquide choisi à partir du groupe composé de l'eau entre la température ambiante et 60 °C; un mélange de l'eau et un alcool de C₁ à C₃ entre 20:80 et 5:95 (v/v) à la température ambiante ; et un mélange de l'eau et d'acétone entre 20:80 et 40:60 (v/v) à la température ambiante ; et séparer le solide et le liquide 15 résultant du lavage, autant de fois que nécessaire pour avoir le liquide de lavage écoulé par moins de 50 g de matériel par litre de liquide de lavage ; (b) effectuer une extraction à partir du solide obtenu dans l'étape (a) à la pression ambiante ou pressurisée, dans les conditions choisies à partir du groupe composé de l'eau entre 80 °C et son point d'ébullition ; un alcool de C₁ à C₃ 20 entre 40°C et son point d'ébullition ; un mélange d'eau et de glycol entre 80°C et son point d'ébullition ; de diméthylformamide entre 80 °C et son point d'ébullition ; et de diméthylsulfoxyde entre 80 et 150°C, et en séparant le solide et le liquide résultant de l'extraction en gardant une température supérieure à 40°C ; (c) refroidir le liquide obtenu en étape (b) et collecter le 25 précipité résultant, en évaporant optionnellement une partie du dissolvant avant le refroidissement ; (d) sécher le précipité obtenu en étape (c) jusqu'à obtention d'un contenu de dissolvant inférieur à 10% du poids ; (e) soumettre le produit obtenu en étape (d) à 120-180°C pendant au moins 3 minutes ; et (f) refroidir le produit obtenu en étape (e).

30 De préférence, le matériel végétal de début pour ce procédé ressemble à une pulpe déshydratée et écrasée. Lorsque la caroube est utilisée, la pulpe sans graines est préférée, mais selon le fruit ou la variété végétale, les graines pourraient être incluses. A partir du matériel végétal non commercial, avant le 35 procédé d'extraction, il doit être lavé par l'eau de douche et séché par une circulation d'air. Le végétal séché est écrasé par un broyeur à marteaux jusqu'à qu'il prenne une taille inférieure à 3 cm.

40 Le procédé de lavage du matériel végétal écrasé est effectué dans des récipients de diffusion ou dans des réservoirs remués avec de l'eau entre la température ambiante et 60°C. Le taux du matériel végétal par rapport à l'eau est entre 1:4 et 1:10 (pds/pds). Comme alternative, le lavage est effectué avec un mélange de l'eau et un alcool de C₁ à C₃ entre 20:80 et 5:95 (v/v) à la 45 température ambiante. L'alcool est de préférence le méthanol ou l'éthanol et plus préférentiellement le méthanol et le ratio du matériel végétal contre le mélange de l'eau et du méthanol est 1:4 (pds/pds). Le lavage peut également être effectué avec un mélange de l'eau et de l'acétone entre 20:80 et 40:60 (v/v) à la température ambiante. Dans un mode de réalisation particulier, le

taux de l'eau : acétone est de 30:70 (v/v) et le taux du matériel végétal par rapport au mélange de l'eau et de l'acétone est entre 1:2 et 1:3 (pds/pds).

5 Le solide et le liquide résultant du lavage sont séparés par centrifugation, la filtration ou la décantation, en répétant le procédé du solide résultant autant de fois que nécessaire pour avoir le liquide de lavage écoulé par moins de 50g de matériel par litre de liquide de lavage, et de préférence moins de 10 g de matériel par litre de liquide de lavage.

10 En cas de produits végétaux qui sont très riches en celluloses il est recommandé qu'une opération de fermentation préalable soit utilisée afin d'augmenter le rendement de l'extraction. Le résidu végétal, dont les composés solubles dans l'eau ont été déjà éliminés, est submergé dans un réservoir avec de l'eau à une température de 37°C (entre 1 et 3 kg d'eau par
15 kilogramme de résidu humide). Dans ce réservoir d'eau, le résidu est ajouté, le pH est rééquilibré à 5 et une enzyme est ajoutée, en particulier bêta-glucosidase (cellulase), entre 1 et 25g par kg de résidu humide, selon la magnitude désirée d'hydrolyse de cellulose, et elle est maintenue remuée à 37°C entre 2 et 4 heures. En fin, la teneur du bain d'hydrolyse est décantée
20 ou centrifugée, le surnageant avec les sucres de l'hydrolyse des celluloses est jeté et le résidu est lavé avec une eau à 50°C (4 kg d'eau par kilogramme de résidu humide), elle est centrifugée encore et le surnageant est jeté.

25 Du solide obtenu à l'étape de lavage, en utilisant le procédé de fermentation intermédiaire ou pas, une extraction est effectuée dans des récipients de diffusion ou dans des réservoirs remués. L'extraction peut être effectuée avec de l'eau entre 80°C et son point d'ébullition dans les conditions de pression ambiante et pressurisée. Le taux du solide par rapport à l'eau est entre 1:2 et 1:3 (p/p). Comme alternative, l'extraction est effectuée avec un alcool de C₁ à
30 C₃ à une température entre 40°C et son point d'ébullition, de préférence le méthanol entre 40°C et son point d'ébullition, et à un taux de solide:méthanol entre 1:4 et 1:6 (p/p). L'extraction peut être également effectuée avec un mélange de l'eau et un glycol, de préférence le glycol de propylène, à une température entre 80°C et son point d'ébullition. En conclusion, l'extraction
35 peut être également effectuée avec du diméthylformamide entre 80°C et son point d'ébullition ou le sulfoxyde diméthylque entre 80-150°C. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'extraction dure de 1 à 4 heures, et plus préférentiellement entre 3 et 4 heures. Le solide et le liquide résultant de l'extraction sont séparés, en maintenant une température supérieure à 40 °C,
40 par l'une quelconque méthode appropriée, à l'instar de la décantation, la filtration ou la centrifugation.

45 Ensuite, le liquide foncé obtenu dans l'étape précédente se refroidit habituellement dans les réservoirs de décantation. Le temps de début peut varier entre 4 et 10 heures. Pendant le procédé un précipité brun foncé est formé qui correspond à la fraction des proanthocyanidines ciblées contenues dans le produit végétal. Au cas où aucun précipité ne s'est formé, il serait convenable de concentrer l'extrait obtenu par l'évaporation du dissolvant à

5 basse température avec une pression réduite dans des conditions de 50 ou 60 °C et de 0,8 à 0,9 kilogramme de pression absolue. Au contraire, en cas d'utilisation des dissolvants universels à l'instar de DMSO, DMF ou des glycols, il est pratique de les diluer avec une eau froide ou avec l'alcool tel que l'éthanol, le propanol, l'iso-propanol ou semblables, ce qui permet la précipitation des proanthocyanidines condensés à une basse solubilité. Le précipité résultant est collecté par des méthodes communes comme la décantation, la filtration ou la centrifugation.

10 Le précipité obtenu dans l'étape précédente est séché, de préférence par une circulation d'air chaud sur des plats jusqu'à ce qu'il y a un contenu de dissolvant inférieur à un 10% en poids. Dans un mode de réalisation particulier, le précipité est séché à 80-90 °C. Ensuite, le produit obtenu est exposé à une température de 120 à 180 °C au moins pendant 3 minutes.
15 Ainsi, en éliminant précédemment l'eau, une augmentation contrôlée et homogène de la température du produit et une polymérisation élevée à une température très élevée sans risque de surchauffe dans les zones déshydratées qui se produit dans des traitements plus longs de polymérisation avec le produit humide est réalisée. Ainsi, le taux de
20 polymérisation est augmenté par rapport aux autres types de traitements de dénaturation.

Enfin, le produit est refroidi. Un produit final est obtenu avec un aspect vitreux, une couleur brune, et qui se casse facilement. Une fois refroidi, il est
25 moulé par des broyeurs à marteaux avec une maille inférieure à 0,5 mm jusqu'à obtention d'une taille inférieure à 180 µm. Il est passé à travers un tamis avec une maille de 180 µm et le produit de couleur brune est récupéré.

30 Par le procédé de l'invention, entre 1 et 20 g du produit d'origine végétale par kg de végétal traité sec sont obtenus, selon la variété agronomique et les conditions de l'extraction.

35 Dans un autre aspect, l'invention fournit une composition pharmaceutique comportant une quantité thérapeutiquement efficace du produit d'origine végétale défini ci-dessus, ainsi que les excipients pharmaceutiquement acceptables. L'invention fournit également un complément diététique comportant une quantité efficace du produit d'origine végétale défini ci-dessus, ainsi que les quantités appropriées d'excipients. En outre un produit
40 alimentaire est fourni, qui comporte une quantité nutraceutiquement efficace du produit d'origine végétale comme défini ci-dessus ainsi que des quantités appropriées d'autres ingrédients comestibles.

45 Les formes de présentation les plus communes pour le produit pharmaceutique et le complément diététique sont les suspensions, les capsules, les comprimés, les poudres ou les granules mais ne sont pas exclues d'autres formes que les personnes qualifiées dans l'art considère viable pour l'administration du produit de l'invention. Le produit alimentaire peut être, sans exclusion, comme biscuits ou semblables, ou sous la forme

de crème à tartiner.

5 Dans un dernier aspect, l'invention est liée à l'utilisation du produit d'origine végétale pour la préparation d'un médicament, d'une composition pharmaceutique, d'un complément diététique ou d'un produit alimentaire pour le traitement et/ou la prévention de la hypercholestérolémie et/ou les maladies cardiovasculaires chez un mammifère, y compris un humain.

10 Dans toute la description et les revendications, le mot "comportant" et ses variations ne sont pas prévues pour exclure d'autres dispositifs, additifs, composants, ou caractéristiques techniques. Les objets, les avantages et les dispositifs additionnels de l'invention seront évidents aux personnes qualifiées dans l'art à l'examen de la description ou peuvent être appris par la pratique de l'invention. Les exemples suivants sont fournis à titre d'illustration, et ne
15 sont pas prévus comme limitation à la présente invention.

DESCRIPTION DETAILLEE DE MODES DE REALISATION PARTICULIERS

Procédé de préparation à partir de la grenade

20 Le début se fait par 1 000 kilogrammes de pulpe broyée de fruits de grenadier. Le contenu dans l'humidité ne devrait pas être supérieur à 10% (pds/pds) et la taille devrait être inférieure à 3 cm. La pulpe broyée est traitée avec l'eau à une température ambiante au taux de 1:10 pendant 4 heures.
25 L'eau de lavage est éliminée avec les produits résolus en la passant par une passoire de 100 µm et le solide entier est collecté et mis avec le reste des solides. Le procédé de lavage précédent est répété deux fois encore afin d'éliminer les molécules solubles dans l'eau. La température du dernier lavage est augmentée jusqu'à 60°C pour une meilleure extraction des restes
30 des produits solubles. Il est recommandé de veillez à collecter tous les solides qui restent dans la passoire de 100 µm. Le résidu solide est traité dans un réservoir avec un reflux, avec un mélange de glycol de propylène et d'eau dans une proportion de 75:25 (v/v) à 95 °C pendant 4 heures pour dissoudre les proanthocyanidines. Le liquide chaud (> 80 °C) est filtré ou centrifugé pour
35 obtenir une solution brune foncée qui contient les proanthocyanidines. Il est concentré sous vide à une température près de 60 °C jusqu'à ce que l'eau soit éliminée. Le liquide obtenu est refroidi jusqu'à la température ambiante (un minimum de 24 heures). Le précipité brun est récupéré par centrifugation et une pâte humide de couleur brune est obtenue. Le résidu liquide précédent
40 est dilué avec de l'eau froide dans une dilution de 1 volume de résidu liquide avec 9 volumes d'eau. Il est laissé pendant 24 heures et le solide formé est récupéré par centrifugation. Il est mis ainsi que le solide obtenu dans l'étape précédente. La pâte crémeuse obtenue est étendue sur les plats formant des couches n'excède pas 0,5 cm d'épaisseur et elle est laissée dans un four de
45 séchage à une basse température, moins de 80-90 °C, jusqu'à ce que l'humidité soit réduite à 10%. La température du four est augmentée jusqu'à 150 °C et elle est maintenue pendant 15 minutes. Le produit obtenu est doté de l'aspect vitreux brun foncé. Il est broyé à une taille particulière inférieure à

170 µm, et passé à travers une passoire de 100 µm. Le rendement est de 1 à 4% du fruit de grenade broyé.

Procédé de préparation à partir de la caroube

5 Le début se fait par la pulpe de caroube, propre, sèche et sans graine. Une quantité de 100 kg de pulpe de caroube est écrasée en la passant une fois par un broyeur à marteaux jusqu'à obtention d'une taille inférieure à 3 cm. Le produit écrasé est mis dans des réservoirs remués, en 400 kg d'un mélange
10 d'eau:méthanol 20:80 (v/v) à une température ambiante pendant 2 heures. Le liquide de lavage est jeté en répétant le procédé quelques fois pour obtenir une élimination du produit à un taux inférieur à 10 g par litre. Ultérieurement la phase solide est séparée par la décantation. Le traitement de diffusion à une température ambiante avec un mélange d'eau : acétone 30:70 (v/v) (2 kg
15 d'eau par kg de résidu humide) est répété avec la phase de solide pendant 3 heures. Plus tard, le liquide d'extraction est séparé par filtration et jeté. Le résidu est évaporé du dissolvant dans des réchauffeurs sous vide, en l'étendant sur des plats à une épaisseur entre 1 et 1,5 cm et le chauffant à 45°C pendant 5 heures. Le solide obtenu est soumis à un traitement de
20 diffusion remuée avec de l'eau (2 kg de l'eau par kg de résidu humide), au 100°C pendant 3 heures. Plus tard, le liquide d'extraction est séparé du matériel insoluble par une filtration chaude et le résidu de solide est jeté. Ce liquide s'est refroidi dans des réservoirs de décantation pour obtenir une température entre 15 et 20 °C, en le maintenant en de telles conditions
25 pendant 6 heures. Le précipité est rassemblé par la décantation ou la centrifugation. La quantité rassemblée change entre 0,2 et 2 kg de poids sec selon l'état du fruit. L'évaporation de l'eau du résidu est effectuée en l'étendant sur des plats à une épaisseur de produit entre 1 et 1,5 cm, et le séchant dans le réchauffeur pendant 12 heures à une atmosphère de 2,0 de
30 pression et de 85 °C, jusqu'à une teneur de l'eau à 10%. En conclusion, lorsque le résidu ne comporte pas plus de 10% de l'eau, le produit sec est soumis à une température de 180°C dans une circulation d'air pendant 3 minutes, suivi du refroidissement à la température ambiante. De cette manière un produit est obtenu, qui, lorsqu'il est froid, est moulu dans des
35 broyeurs à marteaux avec un une maille inférieure à 0,5 mm jusqu'à une taille inférieure à 180 µm. Il est passé à travers un tamis avec une taille nette de 180 µm et le produit fini est obtenu.

Effet du produit d'origine végétale sur la cholestérolémie

40 L'influence sur la cholestérolémie chez les rats a été étudiée à l'aide de trois types de fibre diététique et du produit d'origine végétale de l'invention : la cellulose microcristalline (CEL) AVICEL[®], fibre de caroube (FC) de C.G.A. S.A, polyphénols modifiés (PM) selon le document du brevet ES 2.187.356 et
45 le produit d'origine végétale (POV) de la présente invention. Les fibres étaient incluses dans quatre régimes isocaloriques semi-synthétiques ajustés aux besoins alimentaires des rats. Le régime standard utilisé était AIN 93-G # 110113 Régime Epuré (Dyets Inc., Pennsylvanie), et la seule variable était le

type de fibre alimentaire, toujours dans une proportion de 5% du régime. Les rats masculins de "Wistar" ont été utilisés, del Centro Mixto Departamento de Nutrición y Bromatología I et de l'Instituto de Nutrición CSIC-UCM (Facultad de Farmacia U.C.M.), choisis parmi la même portée. 40 jeunes rats ont été
5 utilisés pour développer une cholestérolémie expérimentale provoquée par la consommation pendant 15 jours de cholestérol 8 g/kg du régime et de la bile de bovine 2 g/kg du régime, tous les deux de Farmitalia-Carlo Erba, Madrid, ainsi que leur régime de maintien. Pendant la période expérimentale les animaux ont été placés en cellules de métabolisme individuelles. Les cellules
10 de métabolisme ont été maintenues dans une salle à 22 ± 2 °C, avec un contrôle automatique d'obscurité et de lumière (12 : 12 heures) et une constante circulation d'air.

Les rats ont été divisés en 4 groupes de 10 rats hypocholestérolémiques
15 (cholestérol de sérum 250 ± 37 mg/dl) qui, dans les mêmes conditions, ont consommé le régime enrichi en cholestérol pour 20 jours de plus, mais en mangeant également chacune des fibres testées par un taux de 5%. Pendant la période expérimentale de 20, jours les animaux ont été alimentés suivant le même protocole. Le cholestérol de sérum initial a été déterminé en extrayant
20 le sang à partir de la veine de queue de l'animal par piqûre, après une vasodilatation dans un bain à 37°C. Le sang a été collecté dans un tube capillaire traité avec l'héparine, et le cholestérol a été mesuré immédiatement par un analyseur automatique. Le cholestérol après les 20 jours a été déterminé en sérum par le tubage de la veine jugulaire, après l'anesthésie
25 des animaux.

Il a été découvert (voir. TABLEAU 1) que la cellulose n'avait pas affecté la cholestérolémie mais le cholestérol de sérum a continué à augmenter chez les animaux qui avaient consommé la cellulose. Au contraire, le reste des
30 fibres a réduit le cholestérol de sa valeur initiale. Néanmoins, le POV a produit une réduction élevée des valeurs de cholestérol de sérum des animaux. Ainsi, les polyphénols insolubles du POV disposent d'un effet de réduction de cholestérol beaucoup plus supérieur que la FC, et supérieur également aux PM, le produit qui a l'effet supérieur sur la cholestérolémie décrit jusqu'à
35 présent dans une fibre alimentaire (voir. L. Pérez-Olleros et al., J Sci Food Agric 1999, vol. 79, pp. de 173 à 8; H.J. Zunft et al., Adv Ther 2001, vol. 18, pp. 230-6; B. Ruiz-Roso et al., Schironia, vol. 2, pp. de 5 à 9). Cet effet semble être produit par l'enlèvement des sels biliaires par les polyphénols insolubles, avec le résultat de la coupure du cycle enterohépatique du
40 cholestérol.

Le Tableau 1 présente l'évolution de la cholestérolémie des rats avec la hypocholestérolémie expérimental, qui a pris des régimes comprenant la
45 cellulose microcristalline (CEL), la fibre de caroube (FC), les polyphénols modifiés (PM) et le produit d'origine végétale de l'invention (POV). Un (a) indique qu'il diffère de manière significative $p < 0,05$ du lot de la CEL ; un (b) indique qu'il diffère de manière significative $p < 0,05$ de la

hypocholestérolémie de base et, un (c) indique qu'il diffère de manière significative $p < 0,05$ du lot des PM.

	Cholestérol de sérum (mg/dl) jour 0	cholestérol de sérum (mg/dl) jour 20
POV	250 ± 37	125 ± 18 ^{abc}
CEL	250 ± 37	275 ± 25
PM	250 ± 37	140 ± 10 ^{a b}
FC	250 ± 37	180 ± 20 ^{a b}

Etude comparative : Comparaison des effets du produit de la présente invention sur ceux générés par un produit obtenu suivant le procédé de WO2004/014150A

- 5 Afin d'effectuer les essais décrits ci-dessous deux produits d'origine végétale ont été utilisés :

Le produit 1 correspond au produit de la présente invention. Ce produit a été obtenu suite au procédé décrit ci-dessus.

10

Le produit 2 correspond à un produit de la situation de l'art. Ce produit a été obtenu suite au procédé décrit dans la demande de PCT No. WO2004/014150A.

15 ETUDE 1

L'effet de réduction des lipides d'une préparation de pulpe de caroube (WO2004/014150A) riche en polyphénols (50%) a été étudié dans une étude pilote non comparative et préliminaire. Plus de 8 semaines, 47 volontaires avec une hypocholestérolémie modérée (cholestérol total 232-302 mg/dl) ont consommé 15g du produit de WO2004/014150A par jour. Après 4 semaines, des réductions moyennes de 7% en cholestérol total ont été notées.

20

ETUDE 2.

25

Dans cet essai humain à double insu, contrôlé par un placebo et randomisé, 58 volontaires avec des taux de cholestérol de sérum élevés (de 200 à 299 mg/dl) ont consommé 15g de fibre de caroube par jour (WO2004/014150A) (groupe de traitement) 15g de placebo (groupe de placebo). Après 4 semaines, la consommation de 15g par jour du produit de WO2004/014150A a mené à une réduction de 9% de cholestérol total par rapport au groupe de placebo.

30

ETUDE 3.

35

L'effet de réduction des lipides d'un produit d'origine végétale (PCT/EP2005/052877) avec un pourcentage élevé des proanthocyanidines (80%) a été étudié dans une étude pilote non comparative et préliminaire. Plus de 4 semaines, 45 volontaires avec une hypocholestérolémie modérée (cholestérol total de 232 à 302 mg/dl) ont consommé 6g du produit de PCT/EP2005/052877 par jour. Après 4 semaines, des réductions moyennes de 30% en cholestérol total ont été notées.

40

ETUDE 4.

45

Dans cet essai humain à double insu contrôlé par un placebo et randomisé, 48 volontaires ayant des taux élevés de cholestérol de sérum (de 200 à 300 mg/dl) ont consommé 8g de fibre de caroube par jour de

PCT/EP2005/052877 (groupe de traitement) et 8g de placebo (groupe de placebo). Après 4 semaines, la consommation de 8g par jour du produit de PCT/EP2005/052877 a mené à une réduction de cholestérol total de 23% comparé au groupe de placebo.

5

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 1 :

Tableau 1

Produit	Volontaires adultes (nombre)	Doses (g/jour)	Traitement (jours)	Groupe de placebo	Réductions de la moyenne totale du cholestérol (%)
WO2004/014150A	47	15g	28	Non	7%
WO2004/014150A	58	15g	28	Oui	9%
PCT/EP2005/052877	45	6g	28	Non	30%
PCT/EP2005/052877	60	8g	28	Oui	23%

10

Ces études montrent que le produit de la présente invention a un effet plus élevé sur le cholestérol de sérum chez l'homme qu'une préparation de pulpe de caroube obtenu suite au procédé décrit dans WO2004/014150A. En fait, comme il est établi à partir des résultats obtenus, l'utilisation d'une quantité efficace du produit de l'invention (environ 50% inférieur à la quantité du produit de la situation de l'art) une réduction du cholestérol total qui est deux cents fois meilleur que la réduction réalisée avec le produit de la situation d'art.

15

REVENDEICATIONS

1. Un procédé de préparation d'un produit d'origine végétale, comportant les étapes de:
- 5
- (a) la réalisation d'un lavage du matériel végétal écrasé avec un liquide choisi à partir du groupe composé de l'eau à une température entre celle ambiante et 60°C ; un mélange d'eau et un alcool de C₁ à C₃ entre 20:80 et 5:95 (v/v) à la température ambiante ; et un mélange d'eau et d'acétone entre 20:80 et 10 40:60 (v/v) à la température ambiante ; et la séparation du solide et du liquide résultant du lavage autant de fois que nécessaire pour avoir le liquide de lavage écoulé par moins de 50g de matériel par litre de liquide de lavage ;
- (b) la réalisation d'une extraction à partir du solide obtenu dans l'étape (a) à la 15 pression ambiante ou pressurisée, dans des conditions choisies à partir du groupe composé de l'eau entre 80°C et son point d'ébullition ; un alcool de C₁ à C₃ entre 40°C et son point d'ébullition ; un mélange d'eau et de glycol entre 80°C et son point d'ébullition ; le diméthylformamide entre 80°C et son point d'ébullition ; et le diméthylsulfoxyde entre 80 et 150°C, et en séparant le solide 20 et le liquide résultant de l'extraction gardant une température supérieure à 40°C ;
- (c) le refroidissement du liquide obtenu en étape (b) et la collecte du précipité résultant, en évaporant facultativement une partie du dissolvant avant le 25 refroidissement ;
- (d) le séchage du précipité obtenu en étape (c) jusqu'à obtention d'un contenu en dissolvant égal ou inférieur à 10% du poids ;
- 30 (e) la soumission du produit obtenu en étape (d) à une température allant de 120 à 180°C pendant au moins 3 minutes ; et
- (f) le refroidissement du produit obtenu en étape (e).
- 35 2. Le procédé selon la revendication 1, où le liquide choisi dans l'étape (a) est l'eau entre la température ambiante et 60°C et le taux du matériel végétal par rapport à l'eau est entre 1:4 et 1:10 (pds/pds).
- 40 3. Le procédé selon la revendication 1, où le liquide choisi dans l'étape (a) est un mélange d'eau et de méthanol entre 20:80 et 5:95 (v/v) à la température ambiante et au taux du matériel végétal par rapport au mélange d'eau et de méthanol est de 1:4 (pds/pds).
- 45 4. Le procédé selon la revendication 1, où le liquide choisi dans l'étape (a) est un mélange d'eau et d'acétone 30:70 (v/v) à une température ambiante et au taux du matériel végétal par rapport au mélange d'eau et d'acétone est entre 1:2 et 1:3 (pds/pds).

5. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, où le liquide choisi dans l'étape (b) est l'eau à une température entre 80°C et son point d'ébullition et le taux du solide obtenu en étape (a) par rapport à l'eau ajoutée est entre 1:2 et 1:3 (pds/pds).
5
6. Le procédé selon l'une quelconque des revendications de 1 à 4, où le liquide choisi dans l'étape (b) est le méthanol entre 40°C et son point d'ébullition et le taux du solide obtenu en étape (a) par rapport au liquide est entre 1:4 et 1:6 (pds/pds).
10
7. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, où dans l'étape (b) l'extraction dure de 1 à 4 heures.
8. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, où dans l'étape (d) le précipité est séché à un température de 80 à 90°C.
15
9. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, où entre l'étape (a) et l'étape (b) une fermentation du matériel est effectuée.
10. Un produit d'origine végétale qui peut être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.
20
11. Le produit d'origine végétale selon la revendication 10, qui est obtenu à partir des dicotylédones.
25
12. Le produit d'origine végétale selon la revendication 11, qui est obtenu à partir du fruit du grenadier.
13. Le produit d'origine végétale selon la revendication 11, qui est obtenu à partir de la pulpe de caroube.
30
14. Une composition pharmaceutique comportant une quantité thérapeutique efficace du produit d'origine végétale comme défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 13, ainsi que les excipients acceptables du point de vue pharmaceutique.
35
15. Un complément diététique comportant le produit d'origine végétale comme défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 13, ainsi que des quantités appropriées d'excipients.
40
16. Un produit alimentaire comportant une quantité efficace selon un critère nutraceutique du produit d'origine végétale comme défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 13, ainsi que les quantités appropriées d'autres ingrédients comestibles.
45
17. L'utilisation du produit d'origine végétale comme défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 13, pour la préparation d'un médicament

pour le traitement et/ou la prévention de l'hypocholestérolémie et/ou des maladies cardiovasculaires chez un mammifère, y compris l'homme.

- 5 18. L'utilisation du produit d'origine végétale comme défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 13, pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention de l'hypocholestérolémie et/ou des maladies cardiovasculaires chez un mammifère, y compris l'homme.
- 10 19. L'utilisation du produit d'origine végétale comme défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 13, pour la préparation d'un complément diététique pour le traitement et/ou la prévention de l'hypocholestérolémie et/ou des maladies cardiovasculaires chez un mammifère, y compris l'homme.
- 15 20. L'utilisation du produit d'origine végétale comme défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 13, pour la préparation d'un produit alimentaire pour le traitement et/ou la prévention de l'hypocholestérolémie et/ou des maladies cardiovasculaires chez un mammifère, y compris l'homme.
- 20