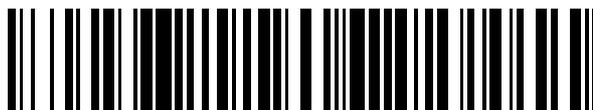


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 595**

51 Int. Cl.:

A61P 3/04 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 36/87 (2006.01)

A61K 36/899 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2006 E 11177041 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 2450084**

54 Título: **Sustancias con propiedades de redistribución de la masa corporal**

30 Prioridad:

03.06.2005 AU 2005902927

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

28.04.2014

73 Titular/es:

HORIZON SCIENCE PTY LTD (100.0%)

Unit 6 84-90 Lakewood Boulevard

Braeside VIC 3195, AU

72 Inventor/es:

KANNAR, DAVID;

KITCHEN, BARRY JAMES y

WEISENGER, RICHARD STUART

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 457 595 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

Sustancias con propiedades de redistribución de la masa corporal

5 **Ámbito de la presente invención**

La presente invención se refiere a formulaciones y composiciones terapéuticas para alterar la distribución de la masa corporal. Más concretamente, la presente invención se refiere a formulaciones terapéuticas que incluyen extractos de melaza enriquecidos con polifenoles y opcionalmente otros compuestos tales como flavonoides, polipéptidos, leucina y otros aminoácidos de cadena ramificada y compuestos lácteos bioactivos, con el fin de emplearlas en métodos ideados para alterar la distribución de la masa corporal.

15 **Antecedentes de la presente invención**

Cualquier referencia a un documento, acto o artículo o discusión de los mismos, mencionada o expuesta en esta descripción, no significa la admisión de que en la fecha de prioridad el documento, acto o artículo de conocimiento o cualquier combinación de los mismos estuviera disponible públicamente, fuera conocido del público, formara parte del conocimiento común general o se considerara relevante como intento de resolver cualquier problema tratado en esta descripción.

20 Aumento de la masa corporal magra

Hay una serie de enfermedades que comportan caquexia (debilidad y consunción corporal) como un síntoma en que el cuerpo pierde cantidades importantes de masa corporal magra. Como ejemplos de estas enfermedades cabe citar la diabetes, el cáncer, el Alzheimer, la bulimia nerviosa y la anorexia.

Por tanto se necesita un tratamiento que permita aumentar el porcentaje de masa corporal magra con un incremento mínimo, o idealmente una reducción, del porcentaje de masa corporal grasa.

30 Polifenoles

Los polifenoles (compuestos con dos o más grupos hidroxilo fenólicos) son una clase de sustancias fitoquímicas que se halla en una variedad de fuentes, incluyendo el vino, las uvas, el cacao y la caña de azúcar. Todos los polifenoles (o compuestos fenólicos) tienen un componente básico común: una estructura de anillo fenólico. Hay al menos 8000 polifenoles identificados en una serie de subcategorías, tales como las antocianinas y las catequinas. Los polifenoles naturales pueden ser desde moléculas simples como el ácido fenólico hasta grandes compuestos muy polimerizados como los taninos. Las formas más corrientes de polifenoles son las conjugadas; en ellas hay varias moléculas de azúcar, ácidos orgánicos y lípidos (grasas) unidas a la estructura del anillo fenólico. Las diferencias en la estructura química conjugada justifican las distintas clasificaciones químicas y la variación de los modos de actuación y de las características sanitarias de los diversos compuestos.

Se considera que los polifenoles tienen varios beneficios para la salud, incluyendo:

- acción antioxidante;
- propiedades preventivas del cáncer;
- protección contra enfermedades cardíacas e hipertensión;
- acción antibiótica/antivírica;
- acción antiinflamatoria;
- propiedades oftalmológicas; y
- protección y fortalecimiento de los vasos sanguíneos.

Los polifenoles son responsables de los pigmentos de color brillante de muchos frutos, hortalizas y flores (desde rosa hasta escarlata, púrpura y azul), protegen las plantas de enfermedades y de la luz ultravioleta, y contribuyen a evitar que las semillas se dañen antes de germinar.

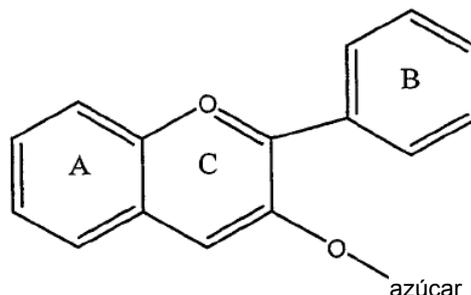
Desafortunadamente, aunque hay mucha información epidemiológica sobre la ingesta regular de fruta y verdura y la prevención de enfermedades, los suplementos dietéticos que contienen antioxidantes fenólicos aislados no han sido suficientemente estudiados en cuanto a la prevención de enfermedades

Se atribuye a productos tales como el té verde, HCA (ácido hidroxícitrico) y la inulina la pérdida beneficiosa de peso basada en que estos productos retrasan la absorción de glucosa y/o regulan la insulina para controlar el apetito, lo cual ya ha sido comprobado en ensayos clínicos controlados con humanos (Functional Food Update 01, National Centre of Excellence in Functional Foods [Noticias de alimentación funcional 01, Centro nacional de excelencia en alimentos funcionales], Australia. June 2006).

Caña de azúcar

5 Las antocianinas son sales polifenólicas de flavilio con unidades de azúcar unidas a la molécula, que proceden principalmente de seis antocianinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina. Estos compuestos difieren en la posición y número de grupos hidroxilo en el anillo B, pero todos tienen una unidad de azúcar en la tercera posición y son hidrosolubles. Con la excepción del grupo de la petunidina, los representantes de todas las demás clases de antocianinas se han encontrado en la caña de azúcar.

10 La estructura básica común de todas las antocianinas es la siguiente:

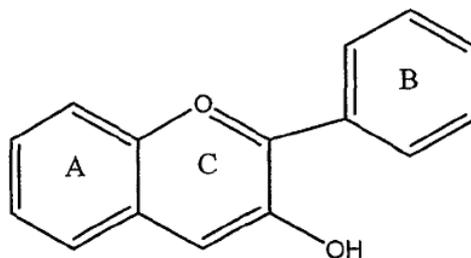
**Té**

15 Sólo después del agua, el té es una de las bebidas más consumidas en el mundo. Anualmente se producen unos 3,0 millones de toneladas de té secado, de las cuales el 20% es té verde, el 2% es oolong (té azul chino) y el resto es té negro (International tea committee Annual bulletin of statistics 2002 [*Boletín estadístico anual del Comité internacional del té*]). Los té negro, oolong y verde son producidos a partir de las hojas de la planta de té *Camellia sinensis*, un miembro de la familia Theaceae (teáceas). Las diversas variedades de té se producen variando el grado de oxidación de las hojas. El té verde se elabora tratando hojas recién cosechadas con vapor a altas temperaturas, lo cual inactiva los enzimas oxidantes. Así se conserva el gran contenido de polifenoles hallado en el té verde. Las hojas de té negro son las más oxidadas, mientras que la oxidación de las hojas de té oolong está a medio camino entre el té verde y el té negro.

25 La mayoría de polifenoles del té son flavonoles, concretamente catequinas. Estas pequeñas moléculas reaccionan entre sí durante el proceso de oxidación por el cual el té negro y el té oolong forman compuestos más grandes, muy coloreados, llamados teaflavinas y tearubiginas.

30 Últimamente se han investigado mucho los potenciales beneficios farmacéuticos de los polifenoles extraídos del té. El agente quimioprotector más potente extraído comúnmente del té es la (-)- epigallocatequina-3-galato (EGCG). También se afirma que los polifenoles del té verde pueden ayudar a perder peso por su capacidad de aumentar el metabolismo y quemar grasas, tal como se ha observado al estudiar el efecto de los polifenoles sobre los niveles de colesterol en sangre. En China los fármacos preparados a partir de los polifenoles del té verde han llegado a formar parte del tratamiento de la nefritis, la hepatitis crónica y la leucemia. En otros países pueden adquirirse suplementos de té verde.

La estructura básica común de todas las catequinas es la siguiente:

**Cacao**

45 El *Theobroma cocoa* es una fuente rica en flavonoides, incluyendo polifenoles. Un estudio sobre el consumo de chocolate negro por humanos ha demostrado que el chocolate rico en flavonoides mejora la función endotelial y aumenta las concentraciones de epicatequina en plasma. Sin embargo en este estudio no se vieron cambios en las mediciones del estrés oxidativo, de los niveles de lípidos, de la presión sanguínea, del peso corporal o del índice de masa corporal [Engler y otros, "Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma

epicatechin concentrations in healthy adults" [*El chocolate negro rico en flavonoides mejora la función endotelial y aumenta las concentraciones de epicatequina en plasma en adultos sanos*] J Am Coll Nutr 2004; 23(3):197-204].

Otro estudio sobre el consumo de chocolate negro no halló cambios en la capacidad antioxidante total del plasma o en la tendencia a la oxidación de los lípidos séricos. El estudio sí encontró que los polifenoles del cacao pueden incrementar la concentración del colesterol HDL, mientras que los ácidos grasos del chocolate pueden modificar la composición de ácidos grasos del colesterol LDL y hacerlo más resistente al deterioro oxidativo [Mursu y otros, "Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans" [*El consumo de chocolate negro incrementa la concentración del colesterol HDL y los ácidos grasos del chocolate pueden inhibir la peroxidación de lípidos en humanos sanos*] Free Radic Biol Med 2004 Nov 1; 37(9): 1351-9].

Inhibidores de ECA

El ECA es una parte importante del sistema renina-angiotensina-aldosterona, uno de los principales sistemas endocrinos del cuerpo. El ECA divide la angiotensina I (ANG-I) dando lugar al potente vasoconstrictor angiotensina II (ANG-II), el cual regula importantes funciones fisiológicas del cuerpo, incluyendo la presión sanguínea, el contenido de sodio corporal y la homeostasis de fluidos, que interviene en su función a través de los receptores celulares AT-1 y AT-2. Se ha demostrado que los inhibidores de ECA sirven para disminuir la presión sanguínea y para tratar la disfunción ventricular izquierda y la neuropatía diabética.

Ha habido varios estudios sobre las diversas funciones de la ANG-II:

- organogénesis (Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. "Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II" [*Crecimiento y desarrollo renal en ratones con falta de receptores AT1A de angiotensina II*]. Am. J. Physiol. 1998;274:F43-F50);
- formación de pre-adipocitos;
- los pre-adipocitos humanos expresan una gran afinidad por los subtipos de receptores AT-1 (Crandall DL, Armellino DC, Busler DE, McHendry-Rinde B, Kral JG. "Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation" [*Receptores de angiotensina II en pre-adipocitos humanos: su papel en la regulación del ciclo celular*]. Endocrinology 1999;140:154-158);
- se ha manifestado que el tejido adiposo blanco es un sitio importante de producción de angiotensinógenos Cassis LA, Saye J, Peach MJ. "Location and development of rat angiotensin messenger RNA" [*Localización y desarrollo del ARN mensajero de angiotensina en ratas*]. 1988; Hypertension 11:591-596);
- estimulación de adipogénesis o formación de células adiposas (grasas) (Darimont C, Vassaux G, Alihaud G, Negrel R. "Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II" [*Diferenciación de células preadiposas: función paracrina de la prostaciclina en la estimulación de células adiposas por angiotensina II*]. Endocrinology 1994;135:2030-2036; Saint-Marc P, Kozak LP, Ailhaud G, Darimont C, Negrel R. "Angiotensin-II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation" [*Angiotensina II como factor trófico del tejido adiposo blanco: estimulación de la formación de células adiposas*]. Endocrinology 2001;142:487-492);
- aumento de la lipogénesis y de la acumulación de triglicéridos en células preadiposas y en adipocitos humanos (Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. "Angiotensin-II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells" [*La angiotensina-II incrementa la lipogénesis en las células 3T3-L1 y en las células adiposas humanas*]. Endocrinology 1997; 138:1512-1519);
- las ratas tratadas con un inhibidor de ECA (losartán) presentan una reducción del tamaño de los adipocitos (Zorad S, Fickova M, Zelezna B, Macho L, Kral JG. "The role of angiotensin-II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity" [*El papel de la angiotensina-II y de sus receptores en la regulación del metabolismo y la celularidad del tejido adiposo*]. Gen. Physiol. Biophys. 1995;14:383-391).

Estos estudios indican en conjunto que la ANG-II juega un papel importante en el desarrollo del tejido adiposo.

Los estudios también han demostrado que los inhibidores de ECA pueden ser útiles para reducir la ganancia de peso.

- En los ratones carentes de angiotensinógenos la ganancia de peso es menor que en los ratones normales de tipo silvestre, aunque la ingesta de comida sea similar para ambos genotipos (Massiera F, Seydoux J, Geloan A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G. y Teboul M. "Angiotensinogen-Deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increase in locomotor activity" [*Los ratones carentes de angiotensinógenos muestran deficiencia de ganancia de peso inducida por la dieta, con alteración del desarrollo del tejido adiposo y aumento de la actividad locomotora*]. Endocrinology 2001; 142(12):5220-5225).
- La sobrealimentación de los roedores aumenta la producción de ANG-II y la infusión crónica de ANG-II provoca una reducción de peso corporal dependiente de la dosis (Cassis LA, Marshall DE, Fettinger MJ, Rosenbluth B, Lodder RA. "Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight" [*Mecanismos que contribuyen a la regulación del peso corporal por angiotensina II*]. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 1998;274:E867-E876).

- En los pacientes humanos obesos e hipertensos la ANG-II aumenta en los adipocitos y puede ser un factor contribuyente en el desarrollo de la resistencia a la insulina, lo cual puede agravarse por la inhibición del reclutamiento de preadipocitos, dando como resultado una redistribución de grasa hacia el hígado y el músculo esquelético. Por este motivo la inhibición del ECA podría frenar el desarrollo de la diabetes de tipo 2 y las funciones patofisiológicas del sistema receptor de renina-angiotensina del tejido adiposo en el síndrome metabólico (Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F, Sharma AM. "The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in metabolic syndrome" [*El sistema renina-angiotensina-aldosterona en el tejido adiposo: su función en el síndrome metabólico*]. (The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2003;35:807-825.)

Sin embargo ninguno de estos estudios revela un método para cambiar la composición de la masa corporal, p.ej. una menor masa grasa y una mayor masa muscular magra. El aumento de la masa corporal magra no está asociado necesariamente a la pérdida de peso. Por tanto aún se necesita un método de este tipo que ayude a los pacientes de caquexia.

Bioactivos lácteos, leucina, péptidos inhibidores de ECA y otros aminoácidos de cadena ramificada

Los bioactivos lácteos, la leucina y otros aminoácidos de cadena ramificada son inhibidores naturales del enzima convertidor de angiotensina (ECA). Los péptidos inhibidores de ECA pueden ser liberados mediante la proteólisis de proteínas lácteas por las bacterias del ácido láctico durante la maduración del queso. También se pueden liberar durante la fermentación de la leche y del suero de leche (Fitzgerald RJ, Murray BA. "Bioactive Peptides and lactic fermentations" [*Péptidos bioactivos y fermentaciones lácticas*]. International Journal of Dairy Technology 2006; 59(2):1118-125). Los péptidos lácteos inhibidores de ECA tienen valores $IC_{50} > 520 \mu\text{m}$ y se pueden administrar en cantidad suficiente mediante leches fermentadas y extractos de productos lácteos fermentados. Aunque se ha propuesto la reducción de peso mediante el uso de productos lácteos (Zemel MB y otros "Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects" [*Aumento de productos lácteos para la pérdida de grasa total y central en sujetos obesos*]. Int. J. Obes. Relat. Meta. Disord. 2005;29(4):391-7), su intervención en el control del peso ha sido recientemente cuestionado (Gunther CW y otros "Dairy products do not lead to alterations in body weight or fat mass in young women in a 1-y intervention" [*Los productos lácteos no alteran el peso corporal o la masa grasa de mujeres jóvenes en un estudio experimental de un año*]. Am. J. Clin. Nutr. 2005;81:751-756).

Obesidad

Un método para aumentar la proporción de masa corporal magra también podría servir para tratar sujetos obesos.

Cualquier persona tiene y necesita tejido adiposo en su cuerpo. Si es excesivo, el resultado es la obesidad. Según la Organización mundial de la salud, en el mundo hay más de 300 millones de adultos obesos y 1,1 billardos de personas con sobrepeso.

El número de americanos obesos y con sobrepeso ha ido aumentando desde 1960, una tendencia que no decae. En USA más de la mitad de los adultos tiene sobrepeso (64,5 por ciento) y casi una tercera parte (30,5 por ciento) son obesos. La obesidad causa cada año, como mínimo, más de 300.000 muertes y los costes de asistencia médica a los adultos americanos obesos ascienden aproximadamente a 100 millardos \$. Tras el tabaquismo es la segunda causa importante de muerte evitable.

La obesidad aumenta el riesgo de adquirir enfermedades como presión sanguínea elevada, diabetes (del tipo 2), cardiopatías, apoplejía, patologías de la vesícula biliar y cánceres de mama, próstata y colon. En nuestro entorno la falta de actividad física combinada con alimentos muy calóricos de bajo coste favorece la tendencia a la obesidad. Si se mantienen, pérdidas de peso tan pequeñas como del 10 por ciento del peso corporal pueden mejorar nuestra salud.

La obesidad y el sobrepeso no son el mismo problema. Su báscula de baño puede indicarle una medida de su peso y ayudarle a cambiarlo, pero no es la mejor manera de determinar si usted tiene sobrepeso o es obeso, o si tiene el riesgo de adquirir obesidad y los problemas de salud que acarrea.

Para ver si una persona es obesa se necesita conocer el índice de masa corporal (IMC) y la circunferencia de la cintura. Se puede tener un IMC que indique un peso saludable, pero una medida de cintura superior al intervalo saludable.

- **IMC:** es una cifra basada en el peso y la altura. Puede ayudar a determinar en qué medida una persona puede tener sobrepeso y proporciona una valoración razonable del total de grasa corporal para la población en general. El IMC tiene una mejor correlación que el propio peso con enfermedades como las cardiopatías y la diabetes de tipo 2. El IMC no es perfecto. Algunas personas, como los atletas, pueden tener un IMC elevado pero más masa muscular que grasa. Los "márgenes" de IMC son números que ayudan a definir si uno tiene un peso saludable, si tiene sobrepeso, si es obeso o muy obeso. Es importante destacar que el IMC es distinto de las tablas de salud / peso.
 - 18,5 hasta 24,9 = peso saludable

- 25 hasta 29,9 = sobrepeso
- 30 hasta 34,9 = obesidad (clase 1)
- 35 hasta 39,9 = obesidad (clase 2)
- 40 o más = obesidad grave (clase 3)

- 5
- Medida circunferencia de la cintura: se usa para determinar los riesgos de salud relacionados específicamente con la grasa abdominal.
 - Para hombres: 40 pulgadas (101,6 cm) o más
 - Para mujeres: 35 pulgadas (88,9 cm) o más

10 Si su medida de cintura es superior a las indicadas arriba y su IMC está comprendido entre 25 y 34,9 puede tener mayor riesgo de contraer diabetes de tipo 2, hipertensión y enfermedad cardiovascular.

15 Causas de obesidad

Hay muchos factores que contribuyen a producir obesidad, incluyendo los genéticos, ambientales y conductuales.

- *Genes*: algunas personas tienden a tener una tendencia genética a ganar peso y acumular grasa. Aunque no todo el mundo con esta tendencia será obeso, algunas personas sin predisposición genética se vuelven obesas. Se han identificado varios genes que contribuyen a la obesidad y los investigadores están elaborando un mapa genético de la obesidad humana para identificar en humanos las dianas genéticas que permitan desarrollar nuevos tratamientos.
- *Ambiente*: un ambiente que promueva un peso saludable es aquel que fomenta el consumo de alimentos nutritivos en cantidades razonables y la actividad física regular. Un ambiente saludable es importante para que todas las personas puedan evitar y tratar la obesidad y mantener una pérdida de peso. El reconocimiento y la evitación consciente de las situaciones de riesgo puede ayudar al esfuerzo por controlar el peso.
- *Conducta*: la adopción de hábitos saludables para controlar el peso durante toda la vida incluye la actividad física regular y la comida nutritiva. Las estrategias conductuales específicas para perder peso y mantenerlo consisten en: registrar en un diario los modelos de dieta y ejercicio y seguirlos, comer una dieta poco calórica, limitar la cantidad de calorías procedentes de las grasas, gastar diariamente calorías haciendo ejercicio rutinario, controlar periódicamente el peso, ponerse metas realistas y desarrollar una red de apoyo social.

El número de personas obesas en el mundo está aumentando a pesar del conocimiento anterior. Por consiguiente se necesitan métodos para modificar la distribución de la masa corporal.

35 La patente JP 2003 137803A revela el uso de un material que contiene polifenoles, extraído de la espiga de caña de azúcar, como principio activo medicinal en cuanto su acción reductora del colesterol, como inhibidor de la absorción de azúcar, como depresor del aumento de glucosa en sangre, como agente antiobesidad, antidiabético, depresor de úlceras gástricas, depresor de problemas hepáticos, agente antimicrobiano y agente antialérgico.

40 Fahey y otros, *The Journal of Nutrition*, vol. 106, nº 10 (1976), páginas 1447-1451, se refieren a la influencia en el crecimiento de las ratas de un complejo fenólico-carbohidrato de color negro obtenido a partir de melazas.

45 Klasing y otros, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 179, nº 4 (1985), páginas 529-538, revelan que la incorporación de glicósidos fenólicos de melazas de caña de azúcar a la dieta de las ratas induce el contenido de citocromo hepático.

Payet y otros, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, nº 26 (2005-12-01), páginas 10074-10079 revelan el uso como antioxidantes de polifenoles de azúcar moreno de caña.

50 **Resumen de la presente invención**

Se ha encontrado sorprendentemente que algunos compuestos pueden alterar el proceso digestivo hasta el punto de variar la distribución global de la masa corporal. En particular, la adición de estos compuestos a los alimentos produce un aumento de la masa corporal magra en comparación con el consumo de la misma comida sin la adición de dichos compuestos. En otras palabras, estos compuestos pueden reducir la cantidad de grasa producida a partir de la comida consumida. Estos compuestos capaces de alterar la masa corporal incluyen polifenoles y bioactivos lácteos.

60 También se ha visto que los flavonoides y los polifenoles pueden inhibir el ECA. Sin querer limitarse a la teoría, se piensa que la acción inhibitoria del ECA está relacionada con la capacidad que tienen estos compuestos para alterar la composición de la masa corporal. No obstante se reconoce que la capacidad de estos compuestos para alterar la composición de la masa corporal también puede estar relacionada con las propiedades antioxidantes (es decir, con polifenoles) y/o con los efectos de la influencia del calcio (es decir, con proteínas lácteas).

5 Conforme a un primer aspecto, se revela un método para variar la distribución de la masa corporal, disminuyendo el porcentaje global de grasa y/o incrementando la proporción de masa magra respecto a la masa grasa mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de uno o más compuestos que tengan al menos un grupo hidroxilo y la facultad de alterar la composición de la masa corporal o de un derivado o profármaco fisiológicamente aceptable de los mismos.

10 También se revela un método que consiste en administrar a un sujeto una formulación terapéutica que incluya una cantidad efectiva de uno o más compuestos que tengan al menos un grupo hidroxilo y la facultad de alterar la composición de la masa corporal o de un derivado o profármaco fisiológicamente aceptable de los mismos, más un soporte aceptable.

15 El primer aspecto también revela una formulación terapéutica, empleada para alterar la distribución de la masa corporal por reducción del porcentaje global de grasa y/o incremento de la proporción de masa magra respecto a la masa grasa, que incluye una cantidad efectiva de uno o más compuestos que tengan al menos un grupo hidroxilo y la facultad de alterar la composición de la masa corporal o de un análogo, derivado o profármaco fisiológicamente aceptable de los mismos, más un soporte aceptable.

20 El primer aspecto también revela el uso de una cantidad efectiva de uno o más compuestos que tengan al menos un grupo hidroxilo y la facultad de alterar la composición de la masa corporal o de un análogo, derivado o profármaco fisiológicamente aceptable de los mismos, junto con un soporte adecuado, en la elaboración de un medicamento para variar la distribución de la masa corporal por reducción del porcentaje global de grasa y/o incremento de la proporción de masa magra respecto a la masa grasa.

25 En esta descripción la expresión “compuestos que tengan al menos un grupo hidroxilo y la facultad de alterar la composición de la masa corporal” se refiere a cualquier compuesto provisto de un grupo hidroxilo que altera la composición de la masa corporal por reducción del porcentaje de grasa y/o incremento de la proporción de masa magra respecto a la masa grasa. Los compuestos pueden ser de procedencia natural, de animales o plantas, o se pueden preparar sintéticamente. Un ejemplo de origen animal es el veneno de serpiente que contiene péptidos. Como ejemplos de procedencia vegetal cabe mencionar los polifenoles de té verde, vino, cacao, caña de azúcar, remolacha azucarera, residuos de caña de azúcar y de remolacha azucarera, melazas y hierbas chinas tales como *Magnolia liliflora* y *Magnolia officinalis*. Otros ejemplos de estos compuestos incluyen (i) flavonoides tales como antocianinas, catequinas, polifenoles, chalconas, flavonoles, flavonas y (ii) polipéptidos, leucina y otros aminoácidos de cadena ramificada y productos bioactivos lácteos como los extractos de suero de leche. Conforme a la presente invención, el compuesto que tiene como mínimo un grupo hidroxilo y la facultad de alterar la composición de la masa corporal se escoge del grupo formado por los extractos de melaza enriquecidos en polifenoles.

35 En esta descripción la expresión “compuestos con acción inhibidora del ECA” se refiere a cualquier compuesto que tenga características inhibidoras del ECA y la facultad de alterar la composición de la masa corporal por reducción del porcentaje de grasa y/o incremento de la proporción de masa magra respecto a la masa grasa. Los compuestos pueden ser de procedencia natural, de animales o plantas, o se pueden preparar sintéticamente. Un ejemplo de origen animal es el veneno de serpiente que contiene péptidos. Como ejemplos de origen vegetal cabe citar los polifenoles de cacao, caña de azúcar, remolacha azucarera, residuos de caña de azúcar y de remolacha azucarera, melaza, uvas, vino, frutas (bayas, drupas, pomáceas, frutos tropicales, zumos), hortalizas (bulbos, raíces, tubérculos, hojas, tallos), hierbas, especias, judías, legumbres, cereales (cebada, alforfón, maíz, mijos, avena, arroz, centeno, sorgo, trigo), frutos secos (almendras, nueces de areca, anacardos, avellanas, cacahuetes, pacanas, nueces), semillas oleaginosas, aceites vegetales, té, café, cerveza, sidra, semillas, té verde, hierbas chinas como *Magnolia liliflora* y *Magnolia officinalis* y mezclas de los mismos. Otros ejemplos de estos compuestos incluyen (i) flavonoides tales como antocianinas, catequinas, polifenoles, chalconas, flavonoles, flavonas y (ii) polipéptidos, leucina y otros aminoácidos de cadena ramificada y productos bioactivos lácteos tales como los extractos de suero de leche. El compuesto inhibidor de ECA se escoge preferiblemente del grupo formado por flavonoides, polifenoles, proteínas lácteas, cacao, productos de cacao, extractos de cacao, extractos de uvas, melazas, extractos de melazas, azúcar con alto contenido de fenoles y mezclas de los mismos.

55 En esta descripción el término “polifenoles” se refiere a cualquier polifenol procedente o derivado de la caña de azúcar, de la remolacha azucarera, de los residuos de la caña de azúcar y la remolacha azucarera y de melazas. El polifenol procede preferiblemente de melazas, extractos de melaza, azúcar con alto contenido de fenoles y mezclas de los mismos. Los polifenoles tienen preferiblemente una gran actividad antioxidante.

60 Según la presente invención se ofrece un método para variar la distribución de la masa corporal por reducción del porcentaje global de grasa y/o incremento de la proporción de masa magra respecto a la masa grasa, que consiste en administrar a un sujeto una cantidad efectiva de extracto de melaza enriquecido con polifenoles.

65 La presente invención también ofrece un método consistente en administrar a un sujeto una formulación terapéutica que contiene una cantidad efectiva de extracto de melaza enriquecido con polifenoles y un soporte aceptable.

La presente invención también proporciona una formulación terapéutica empleada para alterar la distribución de la masa corporal por reducción del porcentaje global de grasa y/o aumento de la proporción de masa magra respecto a la masa grasa, que incluye una cantidad efectiva de extracto de melaza enriquecido con polifenoles y un soporte aceptable.

La presente invención también ofrece el empleo de una cantidad efectiva de extracto de melaza enriquecido con polifenoles, junto con un soporte adecuado, en la elaboración de un medicamento para variar la distribución de la masa corporal por reducción del porcentaje global de grasa y/o aumento de la proporción de masa magra respecto a la masa grasa.

El término "cantidad efectiva" se usa aquí para referirse a una cantidad que es suficiente para variar la distribución de la masa corporal por incremento de la masa magra o reducción de la masa grasa. La proporción de masa magra respecto a masa grasa se incrementa cuando aumenta la masa magra de un sujeto o disminuye la masa grasa del mismo. Debe tenerse en cuenta que un cambio en la proporción de masa magra respecto a masa grasa no implica necesariamente un cambio en el peso total. Un ejemplo de cantidad efectiva para animales es un 1 hasta un 2% de la dieta. Suponiendo que un humano consume normalmente 1000 g de comida al día y que el consumo normal de polifenoles es de 1 g/día, la cantidad efectiva puede estar comprendida entre 2 y 20 g/día, preferiblemente entre 2 y 10 g/día.

La capacidad de un compuesto para reducir la grasa y/o incrementar la proporción de masa magra respecto a masa grasa se puede ensayar mediante el experimento con ratones discutido en los ejemplos. Si se obtiene un cambio estadístico significativo en comparación con el control, el compuesto se puede usar en la presente invención. Un resultado típico en el experimento con ratones es un descenso del 8 al 12% del porcentaje de grasa o un aumento del 4 al 7% en la proporción de masa magra respecto a masa grasa. Para los pacientes humanos de caquexia sería ideal un aumento en la proporción de masa magra respecto a masa grasa de como mínimo el 1 hasta el 2%.

El término "formulación terapéutica" es muy amplio; incluye preparados farmacéuticos enterales y parenterales, productos nutracéuticos, suplementos, alimentos funcionales y preparados de hierbas medicinales. Como ejemplos adecuados de formulación cabe mencionar tabletas, polvos, pastillas masticables, cápsulas, suspensiones orales, suspensiones, emulsiones o fluidos, formulaciones infantiles, alimentaciones enterales, productos nutracéuticos, supositorios, aerosoles nasales, bebidas y productos alimenticios. El soporte puede contener cualquier excipiente adecuado, como almidón o aglutinantes poliméricos, edulcorantes, colorantes, emulsionantes y recubrimientos. El soporte es preferiblemente un producto o ingrediente alimenticio tal como el azúcar o el chocolate.

La formulación terapéutica puede estar en cualquier forma apropiada de administración al sujeto. La formulación terapéutica se puede administrar por vía tópica, oral o por cualquier otra vía de administración.

Tal como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un animal. No hay ninguna limitación sobre el tipo de animal que podría beneficiarse de las formulaciones y métodos descritos en la presente invención. Preferentemente el animal es un mamífero y con mayor preferencia un humano. "Animal" también incluye especies ganaderas como reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras, asnos y aves de corral tales como pollos, patos, pavos y gansos o animales domésticos como gatos y perros. Un sujeto, independientemente de si es o no humano, también puede estar citado como individuo, animal, paciente, huésped o receptor. Las formulaciones y métodos de la presente invención se pueden aplicar en la medicina humana, en las industrias de cosmética y estética, en la medicina veterinaria, así como, en general, a la cría de animales domésticos y silvestres.

Figuras

A continuación se describen formas de ejecución/aspectos de la presente invención, y también algunos que no forman parte de ella, haciendo referencia a las siguientes figuras (en las cuales los asteriscos resaltan diferencias importantes):

- Figura 1 muestra el método de extracción empleado en el ejemplo 4.
- Figura 2 muestra los resultados del contenido mineral óseo del ejemplo 6.
- Figura 3 muestra los resultados de masa muscular magra del ejemplo 6.
- Figura 4 muestra los resultados de masa grasa del ejemplo 6.
- Figura 5 muestra los resultados del porcentaje de grasa del ejemplo 6.
- Figura 6 muestra los resultados del peso corporal total por DEXA del ejemplo 6.
- Figura 7 muestra los resultados del peso corporal total del ejemplo 6.
- Figura 8 muestra los resultados del peso corporal en el momento de la carga de glucosa del ejemplo 8.
- Figura 9 muestra el peso corporal en el momento del análisis por DEXA del ejemplo 8.
- Figura 10 muestra el porcentaje de masa grasa en el momento del análisis por DEXA del ejemplo 8.
- Figura 11 muestra la masa grasa en gramos en el momento del análisis por DEXA del ejemplo 8.
- Figura 12 muestra la masa magra en gramos en el momento del análisis por DEXA del ejemplo 8.
- Figura 13 muestra los resultados de glucosa en sangre del ejemplo 8.
- Figura 14 muestra los resultados de la ingesta de comida del ejemplo 8.
- Figura 15 muestra los resultados de la ingesta de líquido del ejemplo 8.

Figura 16 muestra los resultados de la oxidación de la grasa del hígado del ejemplo 8.

Figura 17 muestra el peso corporal (A), la proporción de grasa corporal (B) y la proporción de masa magra (C) en ratones ECA +/+ (barras vacías) y ECA -/- (barras llenas). Los valores son medias \pm EEM (n = 7 por grupo), *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Figura 18 muestra la ingesta de comida (A) y de agua (B) en ratones ECA +/+ (barras vacías) y ECA -/- (barras llenas). Los valores son medias \pm EEM (n = 7 por grupo), ***p < 0,001.

Figura 19 muestra las imágenes axiales de RM potenciadas en densidad protónica a través del cuerpo de ratones ECA +/+ y ECA -/-. Las áreas blancas brillantes denotan grasa. Cada serie de imágenes representa datos de un solo animal. La punta de flecha blanca indica grasa androide.

Figura 20 muestra la temperatura rectal (A). Actividad espontánea de correr en la rueda: distancia recorrida por día (B), velocidad (C) y proporción de grasa en la materia fecal (D) en ratones ECA +/+ (barras vacías) y ECA -/- (barras llenas). Los valores son medias \pm EEM (n = 5 per grupo para la temperatura rectal, mediciones de la actividad espontánea de correr en la rueda. ECA (-/-): n = 6 y ECA (+/+): n = 7 para el análisis de grasa fecal).

Ejemplos

A continuación se describen varias formas de ejecución de la presente invención y también algunas que no forman parte de ella, haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos

Ejemplo 1

Este ejemplo compara el contenido fenólico y las actividades antioxidantes de los polvos fenólicos que se pueden usar en los métodos de la presente invención.

Métodos

Se comparó el contenido fenólico y las actividades antioxidantes de tres polvos fenólicos: el polvo fenólico de melaza producido por IFT (International Food Technology Company), el polvo fenólico de extracto de uva Hansen HW 65-10 y el polvo de extracto de pepita de uva Vinlife®. Los polvos se disolvieron en metanol del 80% a una concentración de 5 mg/ml. Hubo que diluir más con agua para lograr las concentraciones adecuadas a los respectivos ensayos. Los resultados de estos ensayos figuran en la tabla 1 (abajo).

Resultados

Los datos de la tabla 1 permiten comparar la eficiencia antioxidante relativa de los polvos. La tabla 2 muestra las actividades específicas de los tres polvos, es decir, el número de unidades antioxidantes por unidad fenólica.

Tabla 1: contenido fenólico y actividad antioxidante de tres polvos fenólicos

Polvo	Contenido fenólico (mg de eqs de catequina/gramo)	Contenido de antioxidante (mg de eqs de ácido gálico/gramo)
Polvo de melaza	254	32,2
Extracto de uva Hansen HW 65-10	775	144
Extracto de pepita de uva Vinlife®	533	105

Tabla 2: actividad antioxidante específica de tres polvos fenólicos

Polvo	Actividad específica (eqs de ácido gálico/eqs de catequina)
Polvo de melaza	0,127
Extracto de uva Hansen HW 65-10	0,188
Extracto de pepita de uva Vinlife®	0,197

Discusión

Estos resultados demuestran que el polvo de melaza tiene un contenido de compuestos fenólicos más bajo que el de los otros 2 polvos y una menor acción antioxidante, lo cual es debido probablemente a diferencias de los perfiles fenólicos entre los diversos polvos. El análisis por HPLC indica que el polvo de melaza no contiene muchos de los ácidos fenólicos simples, como el ácido gálico, que son antioxidantes muy potentes. Estos compuestos parecen ser insuficientemente hidrófobos para unirse a la resina XAD 16. No obstante hay diferentes métodos de extracción que sirvan probablemente para extraer estos pequeños compuestos hidrófilos, de modo que se puedan incluir en un extracto de melaza utilizable en un método según la presente invención.

Ejemplo 2 (no forma parte de la presente invención)

En este ejemplo se investiga la capacidad antioxidante del chocolate enriquecido con compuestos fenólicos, en comparación con chocolate no enriquecido.

Método

5 Para el ensayo de la capacidad antioxidante se escogieron 6 piezas de control de chocolate con leche (1 pieza de cada hilera de una tableta de unos 100 g) y 12 piezas de chocolate con leche enriquecido con compuestos fenólicos (2 piezas de cada hilera, alternando 1ª y 3ª, 2ª y 4ª). El chocolate con leche fue suministrado por Cool Health Pty Ltd. Se pesó exactamente una muestra de cada pieza - de entre 1,7 y 2 g - y se introdujo en un tubo de 50 ml. Las muestras de chocolate se desengrasaron añadiendo 20 ml de heptano. Se centrifugaron las muestras y se decantó el heptano. Las muestras se dejaron destapadas en una campana extractora para eliminar las trazas de heptano. Los antioxidantes se extrajeron con 2 alícuotas x 20 ml de metanol del 80%, el primero en una extracción de 2 horas y el segundo durante la noche. Se reunieron los extractos primario y secundario y se ensayaron por duplicado según el método ABTS tras diluirlos 5 veces en agua.

Resultados

Tabla 3: capacidad antioxidante en chocolate

Chocolate de control		Chocolate enriquecido	
Muestra (hilera, posición)	Capacidad antioxidante (mg de eqs de catequina/g)	Muestra (hilera, posición)	Capacidad antioxidante (mg de eqs de catequina/g)
1,1	1,638	1,2	1,832
2,1	1,578	1,4	1,857
3,4	1,572	2,1	2,022
4,2	1,634	2,3	1,859
5,3	1,547	3,4	1,924
6,4	1,557	4,1	1,914
		4,3	1,937
		5,2	1,971
		5,4	1,936
		6,1	2,016
		6,3	1,900

Discusión

La capacidad antioxidante del chocolate de control fue de $1,587 \pm 0,039$ mg de equivalentes de catequina por gramo (media \pm desviación estándar). La capacidad antioxidante del chocolate enriquecido con compuestos fenólicos fue de $1,961 \pm 0,142$ mg de equivalentes de catequina por gramo, lo cual supone un incremento del 21,2% respecto al chocolate de control. Por tanto es posible añadir una cantidad efectiva de polifenoles y distribuirlos uniformemente en una matriz de chocolate, a fin de producir una formulación adecuada para usarla en las terapias descritas.

Ejemplo 3

30 En este ejemplo se investiga el contenido de polifenoles en los extractos de varios productos de caña de azúcar procedentes de diferentes etapas del proceso de refinación del azúcar. Se hizo una valoración en equivalentes de catequina del primer jugo exprimido, del jugo final, del jarabe, de la melaza, del azúcar de baja polarización, de los lodos de molienda, de las partes superiores de la caña y de la espuma.

Resultados

Tabla 4: poder antioxidante de varios extractos de caña de azúcar

Muestra	Poder antioxidante total (EC = equivalentes de catequina)	
	(mg EC/ml)	(mg EC/g de material seca)
Primer jugo exprimido	0,75	3,40
Jugo final	0,12	8,76
Jarabe extraído del jugo clarificado	2,89	3,43
Melaza	23,58	30,0
Azúcar de baja polarización	-	2,34
Filtrado	0,44	3,64
Partes superiores de la caña	0,44	13,54
Espuma	0,23	3,75
Lodos de molienda	-	3,17
Azúcar crudo	0,44	-

Tabla 5: poder antioxidante de extractos de caña de azúcar frente a otras fuentes de polifenoles

Muestra	Polifenoles (mg de equivalentes de catequina/g)	Antioxidantes (µmoles/g)
Chocolate negro	23,9	NT
Chocolate con leche	7,25	18,3
Licor de cacao	41,8	110
Pepita de uva en polvo	301,5	1146
Extracto de hollejo de uva	54,5	181
Tentempié mixto de bayas	12,3	9,33
Jugo mixto	3,35	NT
Lodos de molienda	14,7	26,8
Melaza	17,87	32,58
Azúcar crudo	0,25	0,44

5 El análisis reveló que los extractos de melaza y lodos de molienda contienen una cantidad importante de polifenoles y por tanto se podrían añadir a una formulación adecuada para usarla en los métodos según la presente invención, por lo que respecta a las melazas.

Ejemplo 4

10 Este ejemplo explica la elaboración de un producto de azúcar que contiene polifenoles, el cual se puede usar en una formulación destinada a un método según la presente invención.

15 El diagrama de flujo de la figura 1 ilustra el proceso utilizado para producir un extracto de melaza de caña de azúcar con elevado contenido de polifenoles. La extracción de melazas de caña de azúcar se discute más detalladamente en la solicitud de patente internacional nº 2005/117608.

Se preparó una base de sacarosa de elevado grado de polarización que comprendía en total 99% de sacarosa, glucosa y fructosa (siendo la cantidad de glucosa y fructosa no mayor del 0,5%) y 1% de una mezcla de ácidos orgánicos, sustancias inorgánicas, polifenoles, antioxidantes y polisacáridos. Esta mezcla estaba compuesta de:

- 20 • 600 hasta 2100 microgramos por gramo de una mezcla de ácidos trans-aconítico, oxálico, cis-aconítico, cítrico, fosfórico, glucónico, málico, succínico, láctico, fórmico y acético, con la mayor parte de la mezcla constituida por ácido trans-aconítico en una cantidad comprendida entre 200 y 600 microgramos por gramo;
- 150 hasta 600 microgramos por gramo de sustancias inorgánicas, con una relación de calcio : magnesio : potasio = 50:15:35;
- 25 • 0,2 hasta 0,5 mg de equivalentes de catequina por gramo de polifenoles;
- antioxidantes con una actividad comprendida entre 0,4 y 1,2 micromoles por gramo; y
- 20 hasta 60 microgramos por gramo de polisacáridos.

30 Se preparó un edulcorante rico en compuestos fenólicos, combinando la base de sacarosa de elevado grado de polarización con el extracto rico en polifenoles obtenido arriba.

35 La *espectrometría de masas por electrospray* (ES/MS) se realizó con un aparato Micromass Platform ES/MS. Las muestras se disolvieron en metanol/agua (80:20) se inyectaron en una espira de 20 µl y se eluyeron con metanol/agua (80:20) a 20 µl/min. El análisis MS se efectuó en el modo ion negativo con un voltaje de cono de 40 kV y un rango de masa de 50-700 Da.

El producto de azúcar contenía una cantidad importante de polifenoles y por tanto se podía añadir a una formulación adecuada para usarla en los métodos según la presente invención.

40 **Ejemplo 5** (no forma parte de la presente invención)

Este ejemplo explica la elaboración de un producto comercial de chocolate que contiene polifenoles.

Infusión de grosellas

45 *Mezcla de infusión:* la siguiente mezcla (25 litros) bastó para preparar una infusión de 125 kg de grosellas, que es suficiente para 100 kg de chocolate.

20 litros de vino (p.ej. Shiraz, Merlot o Pinot Noir)

5 litros de extracto de hollejo/pepita de uva

50 125 ml de aromatizante

Mezclar bien en un recipiente grande a temperatura ambiente. Agitar lentamente para asegurar que el extracto de hollejo/pepita de uva se mezcle bien con el vino.

El aromatizante puede ser natural o sintético, dependiendo de la nota específica y del perfil deseado en el chocolate terminado. La base o el vehículo del aromatizante puede ser de alcohol, monosacárido, polisacárido, polidextrosa, polidextrina, dextrina, poliol, almidón, propilenglicol, aceite vegetal, triglicérido o de otro tipo adecuado.

5 Si es preciso también se puede usar una mezcla de infusión no alcohólica, sustituyendo la variedad de vino por otra desalcoholizada. Además se puede añadir una gama de saborizantes no alcohólicos o desalcoholizados a la mezcla de infusión para mejorar el sabor y la incorporación de las grosellas al chocolate.

10 *Infusión de las grosellas:* combinar las grosellas y la mezcla de infusión en un recipiente que se pueda girar para mezclar completamente el contenido. Girar el recipiente regularmente durante las siguientes 24 horas. Filtrar/colar el exceso de líquido, esparcir las grosellas sobre un escurridor y colocarlo en un recinto caliente (40°C) con aire que circule a través de ellas durante la noche.

15 Preparación de chocolate que contiene polvo de pepita de uva y aromatizante

Receta base de chocolate (para 500 kg (lote de 0,5 t):

Ingrediente	Cantidad
Azúcar superfino	200 kg
Leche entera en polvo	70 kg
Licor de cacao (Costa de Marfil)	175 kg
Manteca de cacao desodorizada	50 kg
Lecitina de soja – (añadir primero una mitad y la otra 30-60 minutos antes de terminar el ciclo de conchado)	2,5 kg
PGPR – (añadir primero 1 kg y el resto después de los saborizantes (para bajar la viscosidad))	2,0 kg
Saborizante de vainilla natura - (añadir 30 minutos antes de terminar el ciclo de conchado)	2,0 kg

20 Introducir en la concha siguiendo el orden correcto y conchar durante 12-16 horas a 40°C hasta que el tamaño de partícula del chocolate sea inferior a 20 µ (rango 18 µ – 20 µ). Luego el chocolate se aromatizó con shiraz, pinot o merlot. El chocolate tiene una relación de grasa láctea a manteca de cacao de 0,13.

25 El sabor real del vino varietal en el chocolate se puede acentuar añadiendo una serie de aromas que no solo lo realzan, sino que también sirven para reducir el amargor cuando se agregan cantidades de polifenoles más altas de lo normal para fomentar la salud. Un especialista en química de saborizantes sabe qué mezcla de aromas se puede usar para mejorar la apetencia, la sensación en boca y otras propiedades organolépticas.

30 *Preparación de polvo de semillas* (para un lote 0,5 t de chocolate): pesar 2,25 kg de polvo de pepita de uva Vinlife (Tarac Technologies) y añadirlos a 5 kg de manteca de cacao derretida (45°C). Agregar lentamente con agitación y asegurar que el polvo se disperse uniformemente en la manteca de cacao. Evitar la incorporación de aire durante el mezclado, pero asegurarse de que el polvo esté bien dispersado en la manteca de cacao.

35 *Adición de polvo de semillas al chocolate:* agregar los 5 kg de manteca de cacao que llevan el polvo de semillas dispersado a 0,5 t (500 kg) de chocolate aromatizado con vino, almacenado en un tanque temporal a 40 – 45°C. Añadirlos lentamente y mezclar en el tanque durante 5 minutos o hasta que estén dispersados uniformemente.

Adición de las grosellas infundidas al chocolate

40 Las grosellas filtradas y escurridas (aprox. 5,5 – 5,8 kg) se mezclaron con 40 kg del chocolate aromatizado y templado. La mezcla debe efectiva para asegurar la distribución uniformeme de las grosellas.

Luego la mezcla de grosellas/chocolate se moldea y se enfría.

45 Usando grosellas secas o fruta infundida con vino y polifenoles hidrosolubles dispersados en manteca de cacao se pueden superar las dificultades experimentadas habitualmente con la adición a alimentos tales como el chocolate. También se puede mejorar el sabor con aromas de vino y elaborar un producto apetitoso único con mayor contenido de polifenoles, antioxidante y actividad inhibidora de ECA, para usarlo en las terapias descritas.

50 **Ejemplo 6**

En este ejemplo se ensayaron polifenoles de azúcares o extractos de melaza del ejemplo 4 para determinar el efecto en la distribución de la masa corporal de ratones.

55 Método

En este ejemplo se utilizaron ratones C57B1/6J macho (n = 65) de seis semanas de edad libres de enfermedad. Los ratones se adquirieron del Animal Resource Centre, Canning Vale, WA, Australia. Varios días después de su llegada al recinto de animales, la comida de los ratones se cambió de su dieta normal (3% de grasa) a una dieta rica en grasa y carbohidratos (21% de grasa, 20% de proteína, 49% de carbohidratos, 5% de celulosa, 5% de vitaminas y minerales). Las dietas fueron formuladas especialmente por Specialty Feeds, Glen Forrest, WA, Australia. Todos los animales se alojaron en grupos de 2 a 19-21°C con un ciclo 12:12 de luz:oscuridad.

Tres grupos de ratones (n = 13 ratones por grupo) se mantuvieron con la dieta rica en grasa y carbohidratos que contenía (1) 1% de polvo con contenido de polifenoles; (2) 2% de polvo con contenido de polifenoles; (3) melaza; (4) 1% de sacarosa (control). Las dietas utilizadas en este ejemplo se prepararon combinando 98-99% de la dieta base con 1-2% de los aditivos indicados arriba. Los animales se alimentaron con estas dietas durante 9 semanas.

Durante el periodo de 9 semanas se midió semanalmente la ingesta de comida y agua y el peso corporal. En la semana 9 se determinó la composición corporal de los ratones mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA).

Absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA): se valoró la composición corporal completa de los ratones por DEXA (Norland XR-36) equipado con un paquete de software optimizado para animales pequeños. Los ratones se escanearon ligeramente anestesiados (Ketamil y Rompun). Se empleó un modo de escaneo total del cuerpo que aporta información tal como % de grasa corporal, contenido mineral óseo (CMO), densidad mineral ósea (DMO) y masa magra. Los animales se colocaron boca abajo en el centro, paralelamente al eje longitudinal de la mesa de escaneo.

Resultados y discusión

El polvo de polifenoles y la melaza incorporados a la dieta rica en grasa, al 1 y 2% (PP1%, PP2%), disminuyeron la grasa corporal (en gramos – véase figura 4 o en % del peso corporal - véase figura 5) y aumentaron la masa magra (véase figura 3). El peso corporal y el contenido mineral óseo no resultaron significativamente alterados (figuras 2 y 6). Tras 9 semanas de intervención dietética se realizó la DEXA. El peso corporal determinado por DEXA (suma de las masas magra, ósea y grasa) coincidió mucho con el peso corporal medido en una báscula ($r = 0,98$).

En las figuras 2 a 7 se representan los resultados estadísticos del análisis de varianza unidireccional, seguido de la prueba LSD post hoc de Fisher, frente al control, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

No hubo diferencias en la ingesta de comida o agua (no representadas). Estas figuras no muestran que la melaza redujo la grasa corporal; es decir el % de grasa, media (EEM): control = 36,9 (2,3), melaza = 30,2 (1,7), PP1% = 26,3 (1,6), PP2% = 25,0 (2,8).

Conclusión

Los resultados demuestran manifiestamente que el polvo de polifenoles cambió la composición del peso corporal aumentando significativamente la masa muscular magra y reduciendo significativamente el porcentaje de grasa. Una reducción media del 11,9% de grasa y un 6% de aumento de la masa muscular magra mejorarían significativamente el pronóstico de los pacientes de obesidad, diabetes y caquexia.

Ejemplo 7

En este ejemplo se ensayó la capacidad antioxidante (ORAC) del extracto de melaza del ejemplo 4 empleado en el ejemplo 6 y su influencia en la actividad de la α -glucosidasa y de la α -amilasa.

Materiales y métodos

Preparación de las muestras: se molieron las muestras y se disolvieron aproximadamente 50 mg en 5 ml de metanol. Las muestras se agitaron con vórtex, se sonicaron durante 30 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos (1900 FCR). Se recogió el sobrenadante y se llevó a sequedad. Las muestras se redisolviéron a 10 mg/ml.

Las muestras de polvo de melaza eran directamente hidrosolubles. El polvo de melaza se disolvió en tampón de fosfato (pH 7,4) a una concentración de 1 mg/ml antes del ensayo ORAC. La muestra de polvo de melaza también se extrajo como arriba, para proporcionar datos comparativos de ORAC. El polvo de melaza se disolvió en agua antes de los ensayos de α -amilasa y α -glucosidasa.

Ensayo de la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC): en el ensayo ORAC empleado en este estudio se midió la actividad del antioxidante para captar radicales peróxido inducidos por 2, 2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) a 37°C en la muestra analizada. Se usó fluoresceína como sonda fluorescente. Se midieron los valores ORAC hidrófilos de las muestras.

Los extractos/muestras se ensayaron por el procedimiento ORAC mediante dilución en serie (x 4) con AAA (acetona: agua : ácido acético; 70:29,5:0,5) y por cuadruplicado, empezando con la concentración relevante para la muestra según la capacidad antioxidante aproximada vista en un sondeo inicial. Como control positivo se incluyó un extracto de té verde dispuesto como en la preparación de muestras.

5 El polvo de melaza se disolvió directamente en tampón de fosfato (pH 7,4) y como excepción se ensayó cambiando AAA por el tampón de fosfato (pH 7,4). Como control positivo se incluyó un extracto metanólico de té verde que también se disolvió en tampón de fosfato (pH 7,4).

10 Como patrón de referencia se usó Trolox, un análogo hidrosoluble de vitamina E. Se construyó una curva estándar de Trolox a partir de patrones de Trolox preparados a 100, 50, 25 y 12,5 μM en AAA.

15 Brevemente, en cada pocillo se introdujeron 20 μl de muestras/patrones/control/blanco (AAA), 10 μl de fluoresceína ($6,0 \times 10^{-7} \text{ M}$) y 170 μl de AAPH (20 mM). Inmediatamente después de haberla cargado, la placa se transfirió al lector de placas preajustado a 37°C y se midió 35 veces la fluorescencia a intervalos de un minuto. Las lecturas de fluorescencia se normalizaron respecto a los pocillos del blanco de disolvente. Los valores ORAC finales se calcularon mediante una ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el área neta bajo la curva de declinación de fluoresceína, y se expresaron como micromoles de equivalentes de Trolox (ET) por g de muestra.

20 Ensayos de inhibición del enzima metabolizador de la glucosa

α -Glucosidasa: la muestra de polvo de melaza se disolvió en agua antes de utilizarla en este ensayo. Como control positivo se incluyó fucoidano, que también se disolvió en agua.

25 El enzima glucosidasa se disolvió en tampón de acetato (50 mM, pH 4,5) a una concentración de 0,7 mg/ml, lo cual dio una concentración final de 0,2 U/ml. Se añadieron 50 μl de enzima a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. También se incluyó una serie de pocillos en los cuales se introdujo tampón de acetato en lugar de enzima. Después se añadieron las muestras/controles a los pocillos (5 μl) por triplicado y a continuación el sustrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (concentración final 2 mM). La placa se tapó, se agitó y luego se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción se paró añadiendo Na_2CO_3 0,2 M (100 μl /pocillo). La absorbancia se midió a 405 nm con un lector de placas Victor².

35 La absorbancia de los pocillos que contenían muestra, sustrato y tampón se sustrajo de los respectivos pocillos que contenían el enzima glucosidasa y se calculó el porcentaje de inhibición de las muestras en comparación con los controles de disolvente.

α -Amilasa: la muestra de polvo de melaza se disolvió en agua. Como control positivo se incluyó acarbosa. Las tabletas de acarbosa se trituraron y se disolvieron en etanol acuoso del 50% (56 mg/ml). La solución se sonicó y se centrifugó a 2000 FCR durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se conservó a 4°C.

40 Para determinar la influencia de la muestra 1 en la actividad de la α -amilasa se empleó un kit de ensayo Enzchek Ultra Amylase (sondas moleculares E33651). Brevemente, se preparó un tampón de reacción 1 x (suministrado con el kit) diluyendo el del kit con agua destilada 1:10. Se preparó un vial de sustrato de almidón liofilizado (almidón de maíz DQ[®], conjugado BODIPY[®] FL) añadiendo 100 μl de acetato sódico 50 mM (pH 4,0) y luego 900 μl de tampón de reacción 1 x, seguido de una dilución de 20 veces con tampón de reacción 1 x. Se preparó una solución inicial disolviendo 0,5 mg/ml de α -amilasa porcina (Sigma A3176) en agua destilada, que luego se diluyó con tampón de reacción 1 x para obtener una concentración de 125 U/ml.

50 El ensayo se efectuó con un formato de placa de 96 pocillos. Se añadieron 100 μl de solución enzimática de amilasa a cada pocillo y a continuación las muestras y los controles (5 μl /pocillo). Después se añadió la solución de sustrato (95 μl /pocillo) y se midió la fluorescencia (excitación a 485 nm, emisión a 530 nm) con un lector de placas Victor.

Resultados y discusión

55 En la tabla 6 se presenta el rendimiento de cada producto.

Tabla 6: rendimiento del extracto de cada muestra

Muestra	Masa de muestra (mg)	Masa de extracto (mg)	Rendimiento (%)
Polvo de melaza	49,8	34,2	69
Té verde	48,5	16,3	34

60 *Capacidad antioxidante:* en la tabla 7 se presentan las capacidades antioxidantes de las muestras preparadas como extractos metanólicos. La muestra de polvo de melaza dio la mayor capacidad antioxidante, con un valor ORAC de 4395 μmoles de ET/g de muestra, al generar un extracto o disolver 5020 μmoles de ET/g de muestra directamente en tampón (tabla 8). Ambos valores se consideraron superiores al correspondiente extracto de té verde.

Tabla 7: Capacidad antioxidante del polvo de melaza extraído con metanol, en comparación con un extracto metanólico de té verde (los valores son la media \pm el error estándar de la media)

Muestra nº	Valor ORAC (μ moles de ET/g de muestra)
Polvo de melaza	4395 \pm 229
Té verde	1793 \pm 93,5

5

Tabla 8: Capacidad antioxidante del polvo de melaza disuelto directamente en tampón de fosfato (pH 7,4), en comparación con un extracto metanólico de té verde (los valores son la media \pm el error estándar de la media)

Muestra nº	Valor ORAC (μ moles de ET/g de muestra)
Polvo de melaza	5020 \pm 375
Té verde	1467 \pm 90

10 Ensayos de inhibición del enzima metabolizador de la glucosa

Inhibición de α -glucosidasa: la muestra de polvo de melaza 1 inhibió limitadamente la α -glucosidasa en comparación con el fucoidano (tabla 9). Los datos de este ensayo fueron problemáticos porque la muestra de polvo de melaza tenía una gran absorbancia de fondo, la cual se sustrajo de los correspondientes pocillos que contenían el enzima de glucosidasa. Esto ha podido causar una sobreestimación de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa, ya que la inhibición se calcula en comparación con el control de disolvente, que tiene una absorbancia de fondo relativamente baja.

15

Tabla 9: inhibición (%) de α -glucosidasa por la muestra 1 en comparación con fucoidano (los valores son la media \pm EEM)

20

Muestra	Concentración (μ g/ml)	% de inhibición	IC ₅₀
Polvo de melaza	600	88,9 \pm 0,7	194 μ g/ml
	300	65,7 \pm 0,1	
	150	38,4 \pm 0,5	
	75	12,9 \pm 0,9	
	37,5	1,5 \pm 0,2	
Fucoidano	18,7	- 3,8 \pm 0,5	14 μ g/ml
	37,5	97,4 \pm 5,9	
	18,8	73,5 \pm 7,5	
	9,4	19,3 \pm 2,7	
	4,7	5,7 \pm 3,1	

Inhibición de α -amilasa

La muestra 1 no inhibió la actividad de la α -amilasa en comparación con el control de acarbosa (tabla 10). A partir de estos datos no se pudo calcular un IC₅₀ porque la muestra 1 no inhibió suficientemente la actividad de la α -amilasa. Probablemente se podría calcular un IC₅₀ a concentraciones mucho mayores, pero la relevancia biológica de tal concentración es cuestionable.

25

Tabla 10: inhibición (%) of α -amilasa por la muestra 1 en comparación con acarbosa (los valores son la media \pm EEM)

30

Muestra	Concentración (μ g/ml)	% de inhibición	IC ₅₀
Muestra 1	1200	9,5 \pm 1,7	-
	600	- 3,6 \pm 0,9	
	300	- 22,6 \pm 1,6	
	150	- 30,4 \pm 1,6	
Acarbosa	1000	95,2 \pm 30,1	147 μ g/ml
	500	80,8 \pm 10,2	
	250	61,5 \pm 10,3	
	125	46,4 \pm 9,1	

Conclusión

35

Este ejemplo confirma claramente los ejemplos 1 y 4 demostrando por otro método de medición de la capacidad antioxidante que el extracto de melaza es un potente antioxidante. La potencia relativa del polvo de melaza es como sigue: extracto de pepita de uva > extracto de uva > polvo de melaza > té verde.

A productos tales como el té verde, el HCA (ácido hidroxícitrico) y la inulina se les atribuyen beneficios de pérdida de peso basándose en la suposición de que su consumo retrasa la absorción de glucosa y/o regula la insulina para controlar el apetito. La absorción de glucosa es controlada por la glucosidasa y la amilasa. El extracto de melaza tiene poca actividad inhibidora de glucosidasa y por lo tanto parece que los cambios en la composición corporal se deben a otros mecanismos de acción. Es más probable que el mecanismo implique la inhibición de ECA.

Ejemplo 8 (no forma parte de la presente invención)

Este ejemplo investiga el efecto del extracto de polifenoles del té verde en la distribución de la masa corporal.

Método

Animales y tratamientos: se adquirieron ratas macho Sprague Dawley (n = 48) del Animal Resource Centre (Canning Vale, WA) de 3 semanas de edad. Se dejó que los animales se aclimataran durante 1 semana con pienso de rata Purina y agua. A partir de las 4 semanas de edad se suministró a todos los animales una dieta semisintética rica en grasa (15% de grasa, tabla 6) (Specialty Feeds, Glen Forrest, WA) y se les administró uno de los cuatro tratamientos líquidos: té verde, té negro, galato de epigallocatequina (EGCG) o agua. El té y los extractos de té se administraron como el 100% de su ingesta líquida. Las ratas se mantuvieron con la dieta rica en grasa y el tratamiento a base de té hasta la semana 29. La ingesta de comida y de líquidos se midió diariamente y los pesos corporales se registraron semanalmente.

Tabla 11

Composición de la dieta rica en grasa	
Ingrediente	Composición %
Sacarosa	10,93
Caseína	20,00
Aceite de soja	1,86
Manteca de cacao	2,51
Ghee (grasa de mantequilla)	5,31
Aceite de atún	0,20
Aceite de oliva	4,23
Aceite de linaza	0,91
Celulosa	5,00
Almidón	31,5
Almidón dextrinado	13,2
DL-metionina	0,30
Trazas minerales AIN93G	0,14
Cal (carbonato cálcico fino)	1,31
Sal (cloruro sódico fino)	0,26
Dihidrógeno fosfato potásico	0,69
Sulfato potásico	0,16
Citrato potásico	0,25
Vitaminas AIN93G	1,00
Cloruro de colina al 50% p/p	0,25

Té verde y té negro: se compraron bolsas de té verde y té negro (té verde natural Dilmah® y té negro Dilmah®) a un minorista local. Se pusieron en infusión diez bolsas de té (aproximadamente 2 g de hojas de té/bolsa) en 1 litro de agua corriente dentro de un recipiente tapado durante 3 minutos. Se eliminó el exceso de té contenido en las bolsas y las preparaciones de té se diluyeron hasta un volumen de 2 litros con agua corriente fría, lo cual corresponde aproximadamente a 1 bolsa de té por 200 ml de agua. Se hicieron nuevas preparaciones de té cada dos días.

Galato de epigallocatequina: se disolvió galato de epigallocatequina (EGCG (98%), Sapphire Bioscience, VIC) en el agua de beber y se administró a una dosis de 1 mg/kg/día. Se prepararon soluciones nuevas de EGCG cada día.

Prueba de tolerancia a la glucosa: los animales se tuvieron en ayunas por la noche con acceso libre al líquido. A la mañana siguiente se sujetaron las ratas y las colas se sumergieron en anestésico local (xilocaína) durante 1 minuto. Se hizo un pequeño corte a partir de la punta de la cola y ésta se masajeó desde la base hasta la punta, hasta que apareció una pequeña cantidad de sangre. Se recogieron muestras de sangre (en microcubetas hemocue) y se tomaron muestras de glucosa basal de sangre en ayunas (analyzer Hemocue Glucostat de glucosa en sangre). Luego se administró una carga oral de glucosa (40% de glucosa, bolo de 2 g/kg de peso corporal) por sonda gástrica y se midió la glucosa en sangre a intervalos de 30 minutos durante 2 horas.

Absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA): se determinó la composición corporal por absorciometría de rayos X de energía dual, usando un absorciómetro Hologic QDR-4000/W. Los animales se anestesiaron ligeramente

(Nembutal, I.P., 40 mg/kg) y se colocaron en posición supina sobre la plataforma de escaneo. Las colas se fijaron in situ con cinta adhesiva y se escaneó todo el cuerpo. Se midió la masa grasa, la masa magra y la masa total junto con el porcentaje de grasa y el contenido mineral óseo. La correlación de la masa total medida por DEXA con la masa medida al pesar el animal fue muy alta ($r = 0,99$).

Análisis estadístico: se compararon los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa por análisis de varianza bidireccional (mediciones repetidas) y se utilizó un análisis de varianza unidireccional para comparar los resultados de insulina por DEXA y en plasma. Después de ambos análisis se llevó a cabo la prueba LSD. Los resultados fueron significativos cuando $p < 0,05$. Todos los resultados son valores medios \pm EEM.

Resultados y discusión

Las figuras 8 a 16 muestran los resultados obtenidos.

- Como resultado de la intervención no se observó ningún cambio en los niveles de glucosa en sangre.
- El peso corporal de las ratas fue parecido después de todos los tratamientos. En general los polifenoles no alteraron el peso corporal.
- A las 11 y 18 semanas el porcentaje de masa grasa en el caso de los tratamientos con té verde y té negro fue significativamente menor que el de los controles con agua. A las 18 semanas el resultado del porcentaje de masa grasa para el EGCG también fue significativamente distinto al del control con agua. Los polifenoles indujeron una menor producción de masa grasa tanto con la dieta alimenticia como con el control con agua.
- A las 11 y 18 semanas los gramos de masa magra en el caso de los tratamientos con té verde y EGCG fueron significativamente mayores que en el control con agua. Los polifenoles indujeron una mayor producción de masa magra. La diferencia en el contenido de polifenoles entre el té verde y el té negro parece ser la razón por la cual el té negro no alteró significativamente la masa magra en comparación con el control de agua.

Ejemplo 9

En este ejemplo se valoraron ratones con el enzima convertidor de angiotensina inactivado (ECA -/-) genéticamente ("knockout"), para ver si desarrollaban un fenotipo con menor masa grasa.

Materiales y métodos

Ratones: se consiguieron ratones knockout ECA (+/-) heterocigóticos, macho y hembra, del laboratorio de Pierre Meneton, Inserm, U367, Paris, Francia, y se mantuvieron en el recinto animal sobre un fondo C57BL/6J. Se criaron ratones ECA (+/-) heterocigóticos para producir descendencia de tipo silvestre (ECA +/+) y homocigótico sin ECA (ECA -/-). Para genotipar descendencia ECA (-/-) y ECA (+/+) se empleó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, incorporando la tecnología de sondas Taqman[®] con marcación dual (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los ratones se alojaron en jaulas individuales de plástico con tapa de rejilla inclinada (Wiretainers, Melbourne, Australia). En la parte inclinada de la tapa había comida libremente disponible (Barastoc, Mouse Breeder cubes, Barastoc Stockfeeds, Australia) y también había acceso libre a agua corriente. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Para el estudio se seleccionaron machos ACE (+/+) de la misma edad y pares de ratones ACE (-/-) de 12 meses de edad que habían estado en idénticas condiciones de alojamiento. La cantidad de comida y agua consumida se controló diariamente durante una semana.

Visualización in vivo de la distribución de tejido adiposo mediante la técnica de imagen por resonancia magnética (IRM): la distribución regional de la grasa corporal se visualizó mediante imágenes de resonancia magnética (IRM). Las imágenes se captaron con un escáner Bruker BIOSPEC 47/30 dotado de un magneto horizontal 4.7 T Oxford. Se obtuvieron imágenes axiales potenciadas en densidad protónica con los siguientes parámetros: número de cortes 20; grosor de corte 1 mm; campo de visión (CDV) 6 cm; matriz 256 x 256; tiempo de repetición (TR) 815 ms; tiempo de eco (TE) 17,9 ms. Los ratones se anestesiaron colocándolos en una cámara de inducción con exposición a una concentración de isoflurano (Abbott Australiasia Pty Ltd, Sydney, Australia) del 5% v/v en aire de calidad médica y subsiguiente reducción a una concentración del 2%.

Análisis de la composición corporal por absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA): la composición total del cuerpo de los ratones ECA (-/-) y ECA (+/+) se evaluó por DEXA (Hologic QDR 4500, Hologic Inc. USA) equipado con un paquete de software (versión 3.07) optimizado para animales pequeños. Los animales se escanearon en posición boca abajo ligeramente anestesiados (0,02 ml/g de peso corporal) con una mezcla de ketamina (0,75 ml de 100 mg/ml de Ketaplex, Apex Lab.) y xilazina (0,25 ml de 20 mg/ml de Rompun, Bayer).

Análisis de sangre: al final del ensayo los ratones se sacrificaron por sangrado desde el corazón, bajo anestesia por inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina y xilazina como la descrita arriba. La sangre se recogió con jeringas recubiertas de heparina y se midió inmediatamente el hematocrito después de aspirar la muestra a un tubo capilar y centrifugarla en una microcentrífuga (HERMLE Z 233 M-2, Medos Company Pty Ltd, Victoria, Australia) durante 5 minutos a 10.000 rpm. A continuación el plasma se separó por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada (Sorval-RT7) y se conservó a -80°C hasta completar el análisis bioquímico. Los triglicéridos, el colesterol total y los niveles de glucosa en el plasma se midieron por espectrofotometría según

los procedimientos descritos, en kits comercialmente disponibles (Beckman-Coulter Inc., Fulerton, CA, USA). En los ratones ECA (-/-) y ECA (+/+) (n = 6), la leptina plasmática se midió del modo anteriormente descrito.

5 *Medición de la temperatura interna corporal (temperatura rectal):* la temperatura se midió mediante termopares de tipo K conectados a un termómetro electrónico Fluke 52 (John Fluke Manufacturing) de canal dual. Para medir la temperatura rectal se insertó un termopar (con la punta recubierta de silicona) 2 cm en el esfínter anal de cada ratón. La punta del termopar y los cables de conexión se recubrieron con gel de lidocaína al 5% p/v (xilocaína, Astra Pharmaceuticals) como anestésico local y lubricante. Las mediciones de temperatura se hicieron al mismo tiempo en cuatro días consecutivos y se tomó la media de estas cuatro mediciones.

10 *Actividad física espontánea de correr en la rueda:* se dejó a los animales libre acceso durante 14 días a las ruedas giratorias equipadas con un velocímetro (Sigma Sport BC 700 calibrado para el radio de la rueda giratoria) instalado en la jaula individual de plástico con tapa de rejilla. Se midió diariamente durante 10 días la distancia recorrida (km) y la velocidad (km/h). Los ratones tuvieron acceso libre a comida y agua.

15 *Análisis del contenido de grasa fecal:* se recogieron las heces de las jaulas de los ratones durante un periodo de una semana y se guardaron en el congelador (-20°C) a hasta el análisis. Se extrajeron los lípidos de 5 g de heces con una solución 2:1 de cloroformo : metanol. El contenido total de lípidos se determinó gravimétricamente tras 24 horas de extracción a temperatura ambiente. Se determinó el peso seco de las heces en el residuo del extracto de lípidos. El peso seco total de las heces se calculó añadiendo el peso de grasa al peso seco del residuo fecal.

Análisis estadístico: todos los datos están indicados como valor medio \pm EEM. Las diferencias entre los dos grupos se analizaron mediante una prueba t-student (Statistica, Statsoft, USA).

25 Resultados

Tabla 12: composición del plasma y hematocrito de ratones ECA +/+ y ECA -/-

Parámetro	ECA +/+	ECA -/-
Triglicéridos (mmoles/l, n = 7)	0,85 \pm 0,26	0,47 \pm 0,06
Colesterol (mmoles/l, n = 7)	1,68 \pm 0,14	1,97 \pm 0,11
Glucosa (mmoles/l, n = 7)	14,31 \pm 1,72	10,81 \pm 0,87
Hematocrito (% , n = 5)	40,5 \pm 0,9	27,5 \pm 1,1***

Los valores están expresados como media \pm EEM; ***p < 0,001 (ECA -/- frente a ECA +/+)

30 *Peso corporal, grasa corporal, ingesta de comida y agua:* en comparación con los ratones ECA (+/+), los ratones ECA (-/-) pesaron un 14 - 16% menos (p < 0,01; fig. 17A) y tuvieron un 50-55% menos de grasa corporal (p < 0,001; fig. 17B). Los ratones ECA (-/-) tuvieron una proporción de masa corporal magra significativamente incrementada respecto a los ratones ECA (+/+) (fig. 17C).

35 La ingesta de comida fue similar (18A), pero los ratones ECA (-/-) más del doble de agua que los ratones ECA (+/+) (p < 0,001; fig. 18B). El nivel de leptina en sangre de los ratones ECA (-/-) tendió a ser menor que el de los ratones ECA (+/+) (1,5 \pm 0,3 frente a 8,1 \pm 2,8 nmoles/l: F(1,4) df = 5,60, p < 0,07, n = 3 por grupo) y estaba relacionado con la grasa corporal (r = 0,85, p < 0,05).

40 Hueso – no se observó ninguna diferencia importante entre los ratones ECA (-/-) y ECA (+/+) , ni en proporción de contenido mineral óseo (2,2 \pm 0,06 frente a 2,1 \pm 0,05, n = 7 por grupo) ni en densidad mineral ósea (0,076 \pm 0,002 frente a 0,078 \pm 0,001 g/cm², n = 7 por grupo).

45 *Visualización de las masas grasas locales por IRM:* las áreas blancas brillantes en las imágenes IRM potenciadas en densidad protónica son grasa. La comparación visual de series de imágenes axiales demostró que el tejido adiposo disminuyó marcadamente en los ratones ECA (-/-) respecto a los ratones ECA (+/+) (fig. 19). Este efecto fue más notable en la masa grasa abdominal, tal como señala la flecha.

50 *Temperatura interna corporal, nivel de actividad física espontánea y excreción de grasa:* no se observó ninguna diferencia importante entre los ratones ECA (-/-) y ECA (+/+) en cuanto a temperatura interna corporal (fig. 20A), actividad espontánea (promedio de distancia recorrida, fig. 20B, y de velocidad, fig. 20C) o proporción de grasa en la materia fecal (20D).

55 *Hematocrito y composición del plasma:* en comparación con los ratones ECA (+/+) , los ratones ECA (-/-) tuvieron un hematocrito más bajo (p < 0,001). No se notó ninguna diferencia en los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos (TG) y colesterol total.

Conclusión

Dado que se produjeron los mismos cambios fisiológicos al emplear modelos animales carentes de ECA y diversas fuentes de polifenoles (té, melazas y extracto de melaza), los resultados apoyan la deducción de que los polifenoles actúan mediante un mecanismo de inhibición del ECA.

- 5 Tal como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones, el término “comprende” y formas del mismo no limitan la presente invención excluyendo cualquier variante o adición.

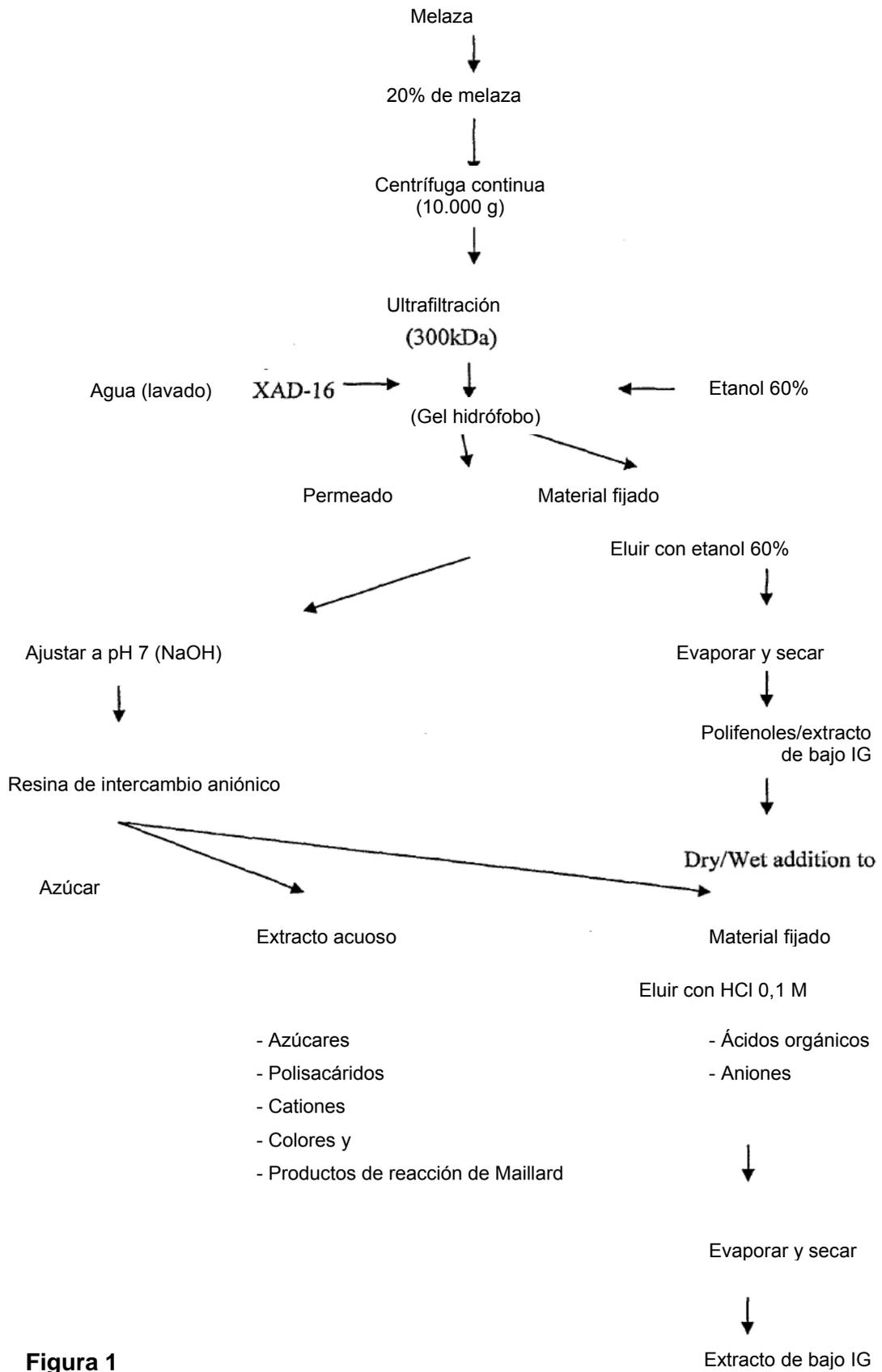
Las modificaciones y mejoras de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la materia. Estas modificaciones y mejoras están consideradas dentro del alcance de la presente invención.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cantidad efectiva de un extracto de melaza, enriquecido con polifenoles procedentes de melazas o de extractos de melaza, para reducir terapéuticamente el porcentaje global de grasa y/o aumentar la proporción de masa magra respecto a masa grasa.
2. El extracto de melaza para el uso según la reivindicación 1, que tiene una gran actividad antioxidante.
- 10 3. El extracto de melaza para el uso según la reivindicación 1 o 2, en que la cantidad efectiva es del 1 al 2% del peso total de comida consumida.
4. El extracto de melaza para el uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en que la cantidad efectiva para un humano es de 2 a 20 g/día.
- 15 5. El extracto de melaza para el uso según la reivindicación 1, en que el aumento de la proporción de masa magra respecto a masa grasa en un paciente humano de caquexia es de al menos un 1 hasta un 2%.
- 20 6. Formulación terapéutica que contiene un extracto de melaza según la reivindicación 1, junto con un vehículo aceptable, para alterar la distribución de la masa corporal en un sujeto, reduciendo el porcentaje global de grasa y/o aumentando la proporción de masa magra respecto a masa grasa.
7. La formulación terapéutica según la reivindicación 6, en la cual el vehículo aceptable es un producto o un ingrediente alimenticio.
- 25 8. Uso de una cantidad efectiva de un extracto de melaza, enriquecido con polifenoles procedentes de melazas o de extractos de melaza, en la preparación de un medicamento para alterar la distribución de la masa corporal en un sujeto, reduciendo el porcentaje global de grasa y/o aumentando la proporción de masa magra respecto a masa grasa en el sujeto.

30



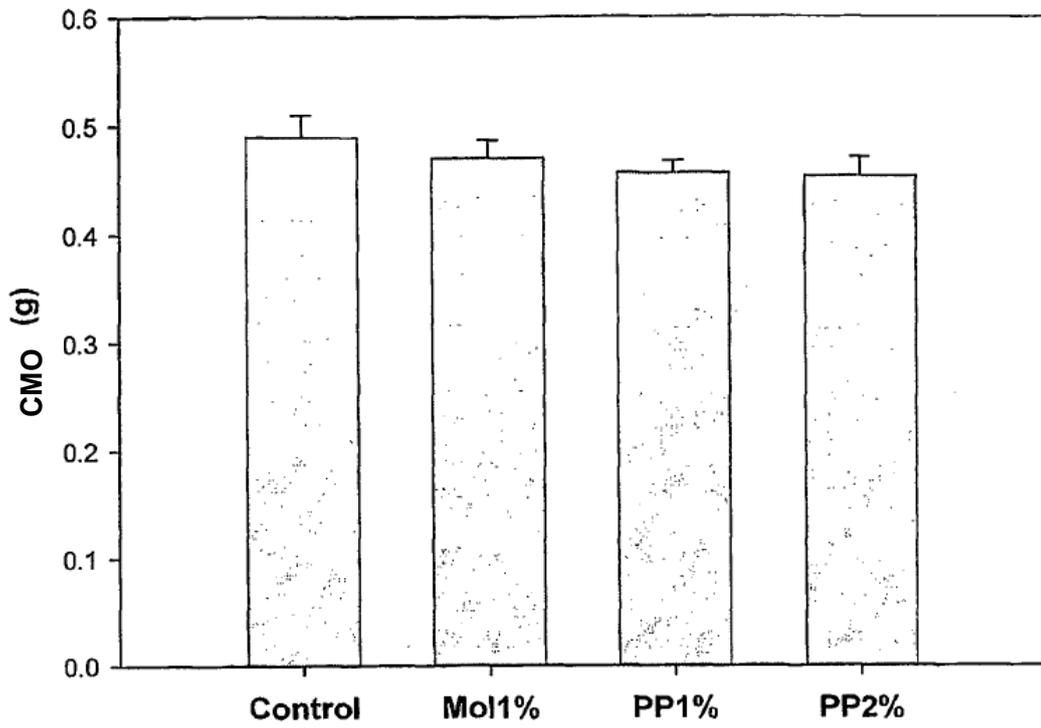


Figura 2

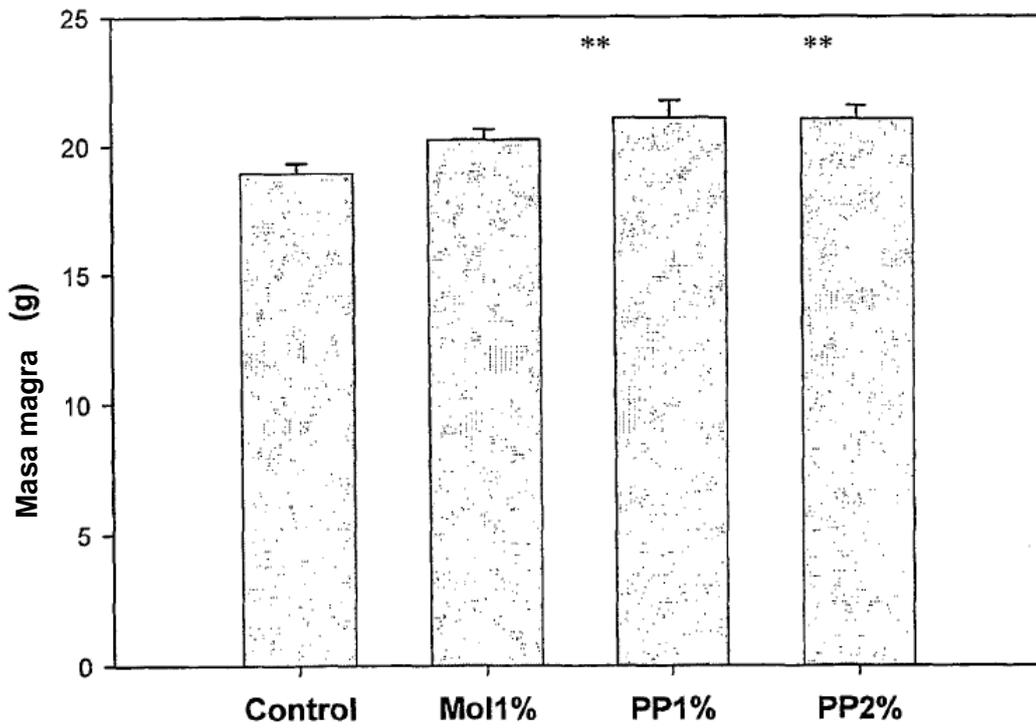


Figura 3

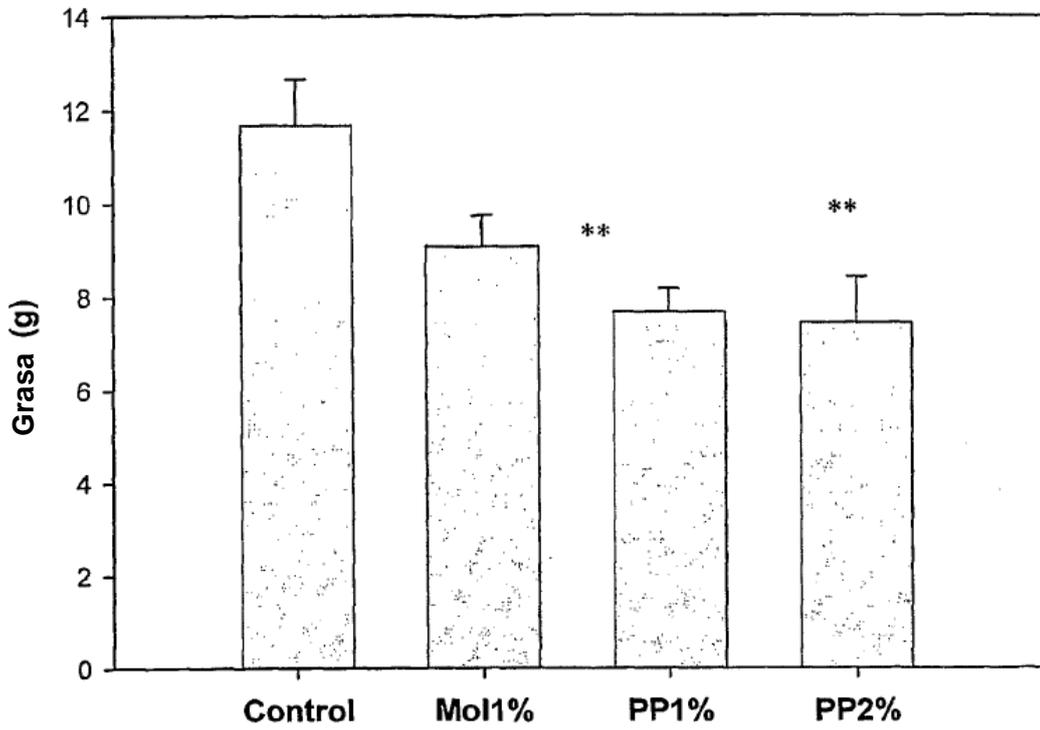


Figura 4

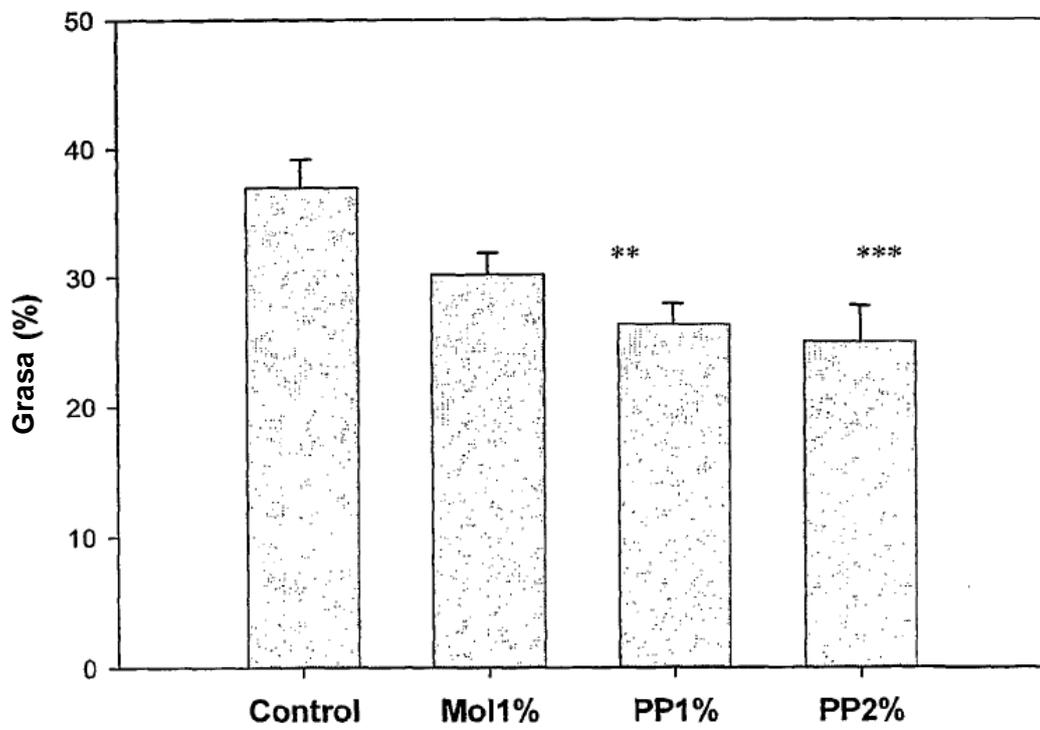


Figura 5

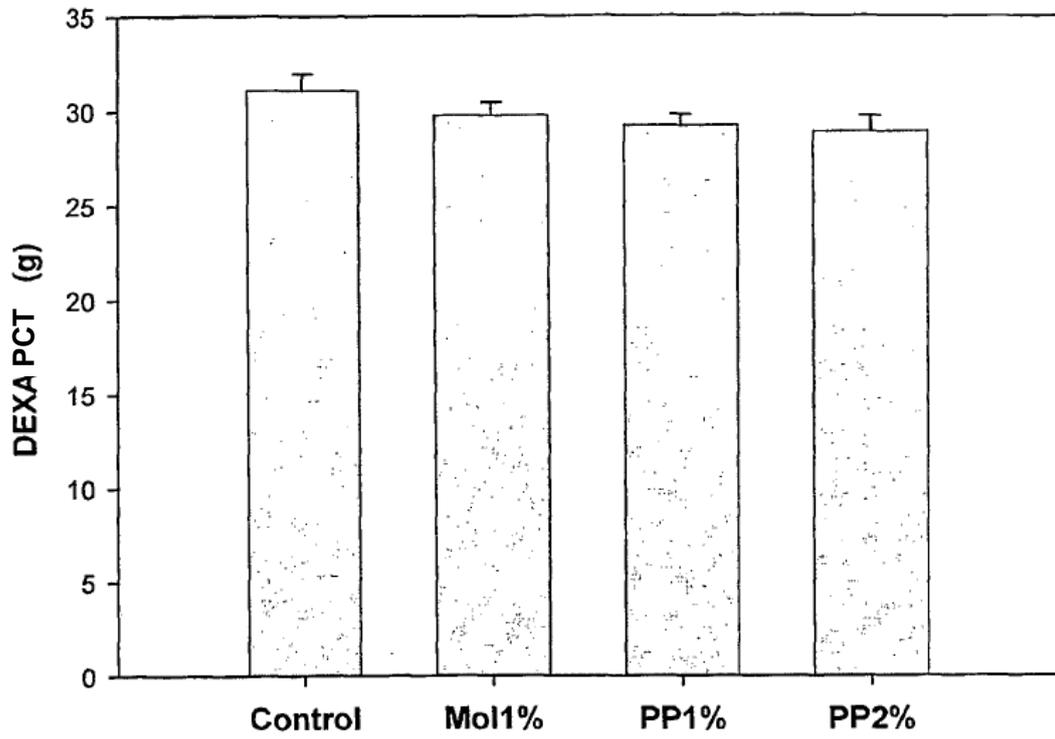


Figura 6

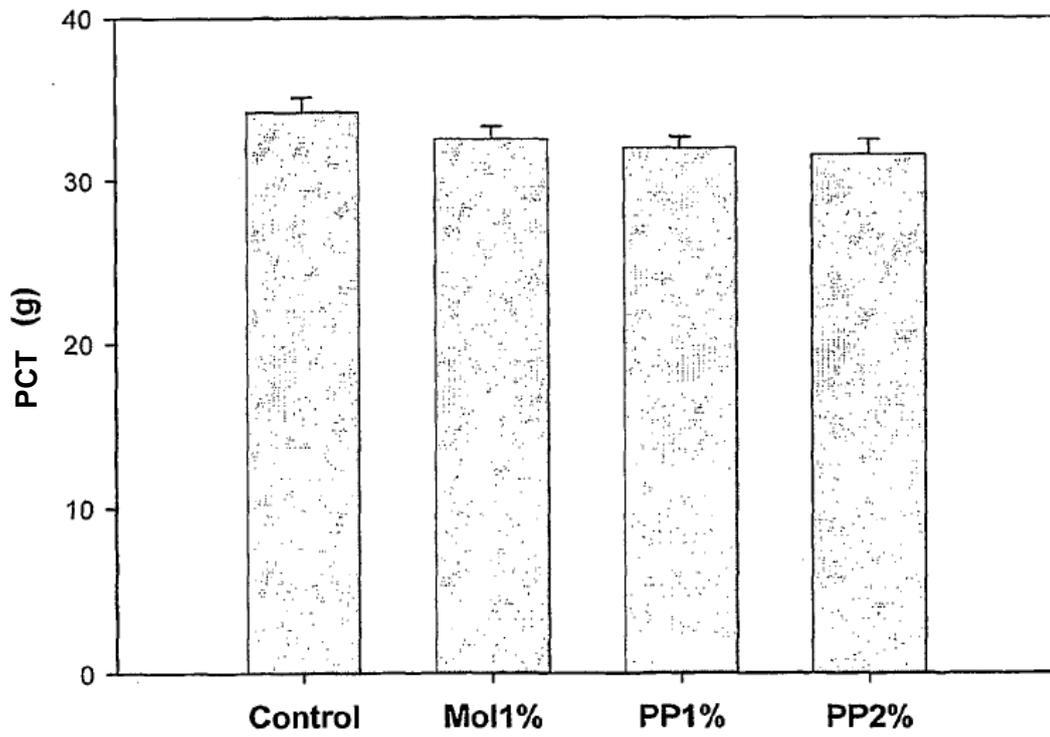


Figura 7

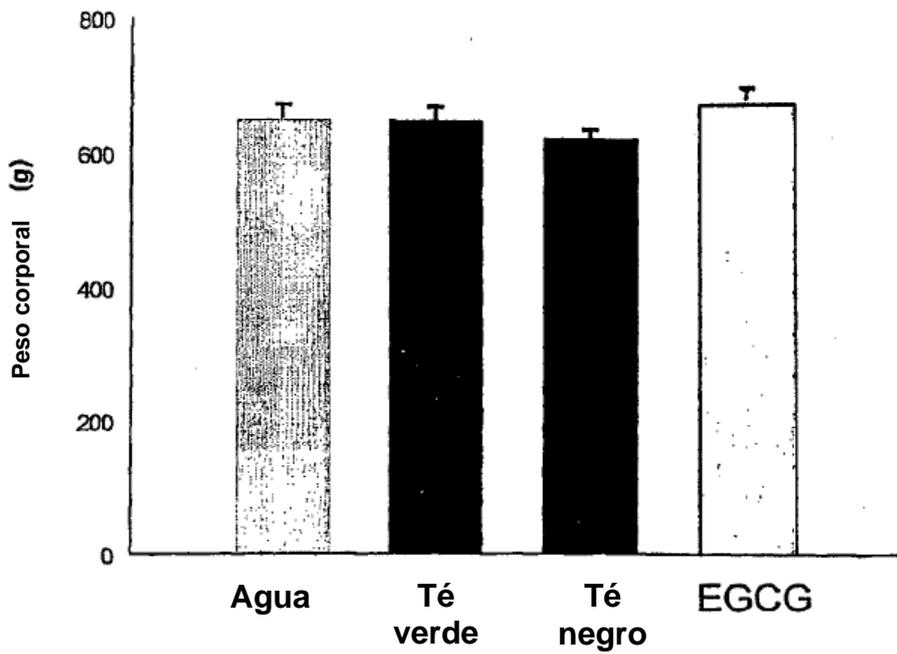


Figura 8

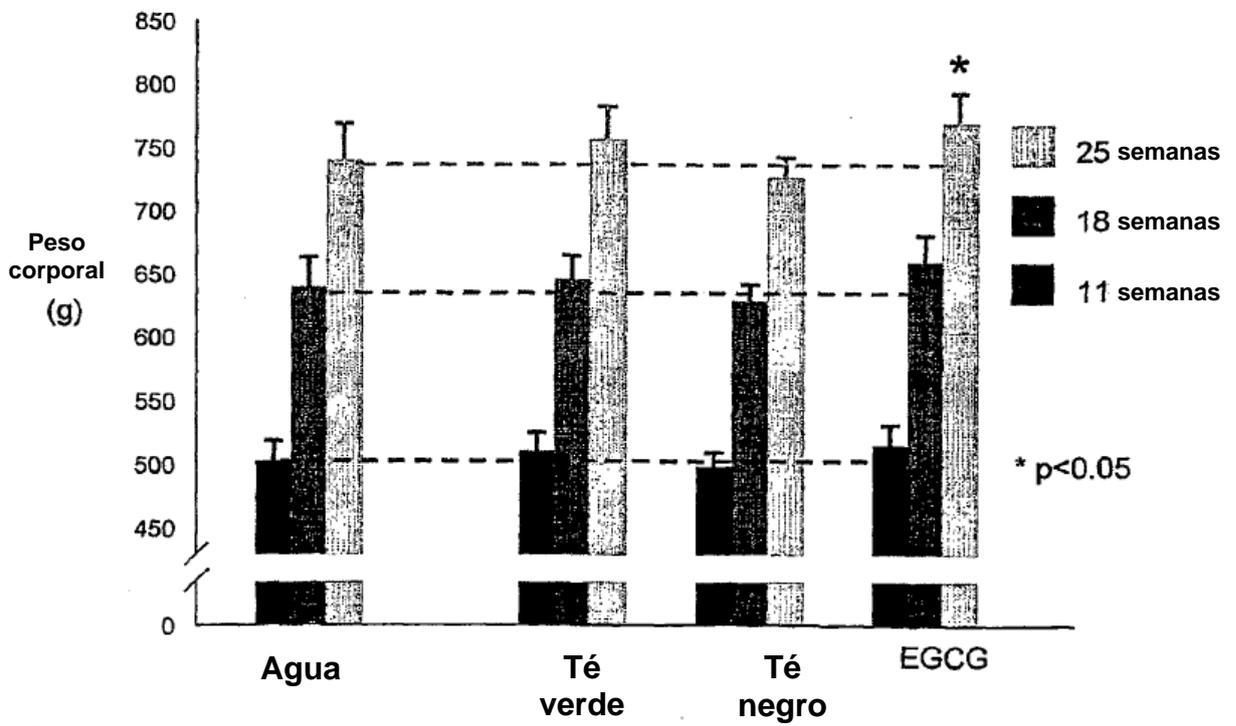


Figura 9

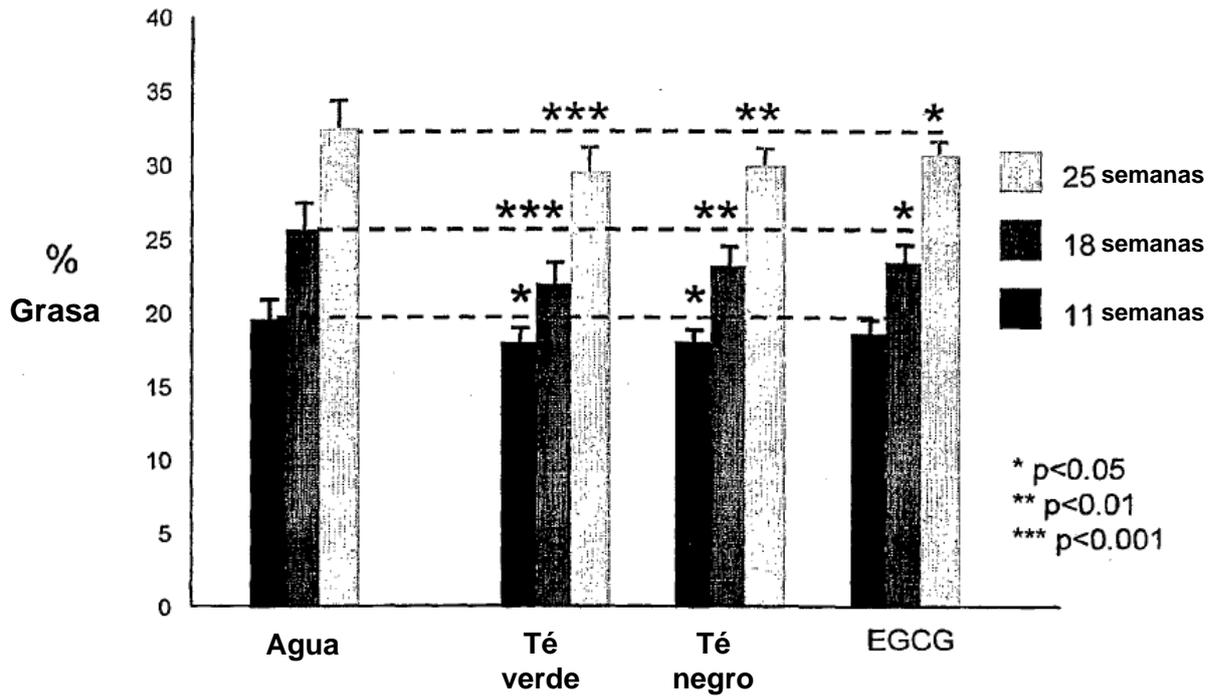


Figura 10

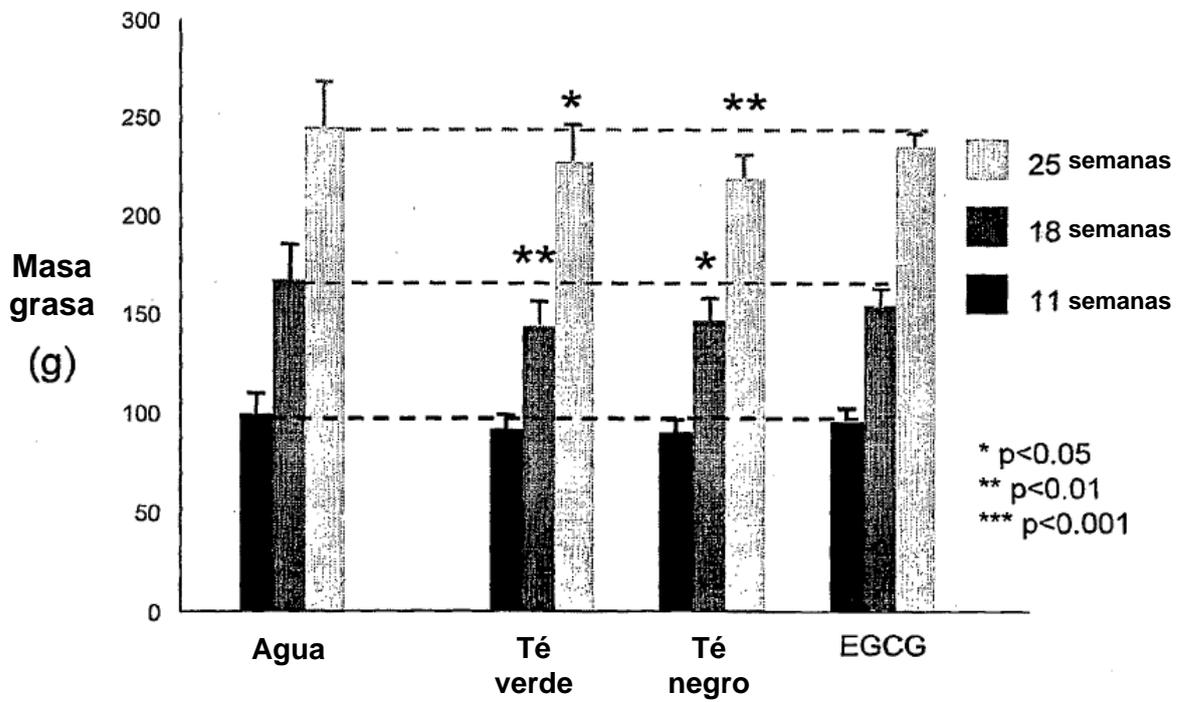


Figura 11

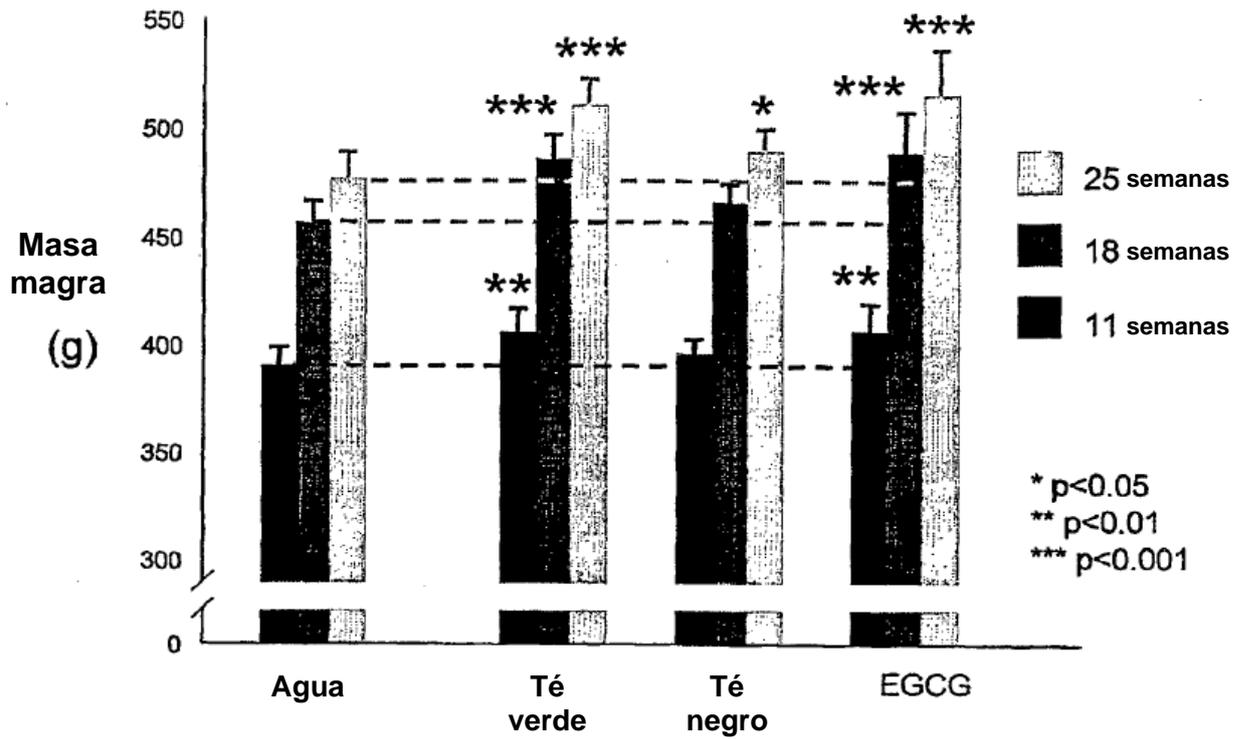


Figura 12

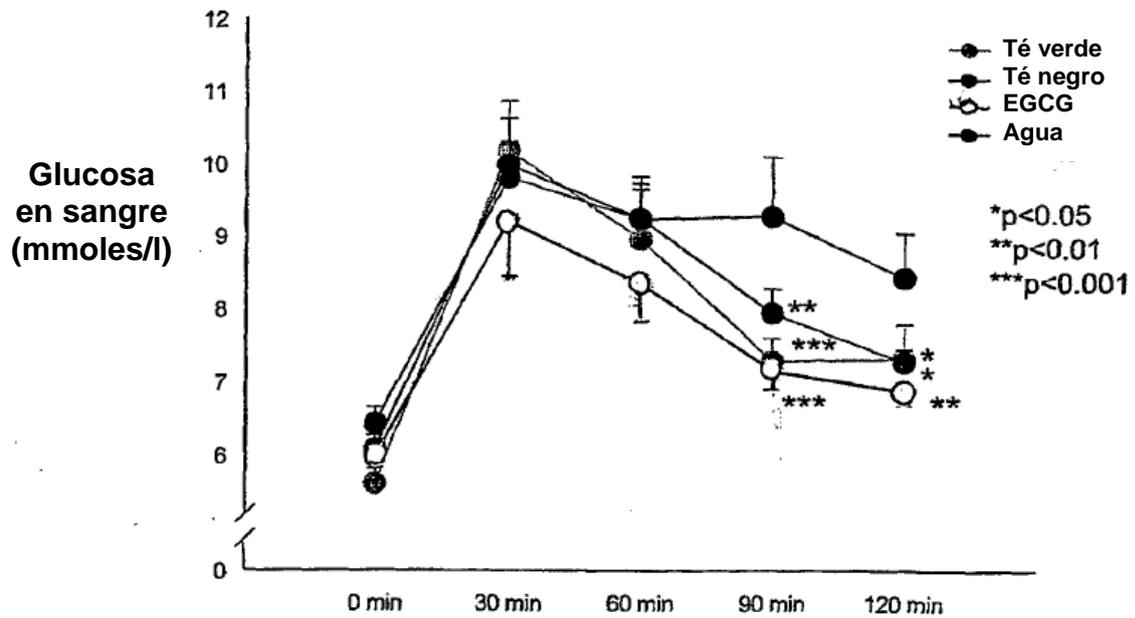


Figura 13

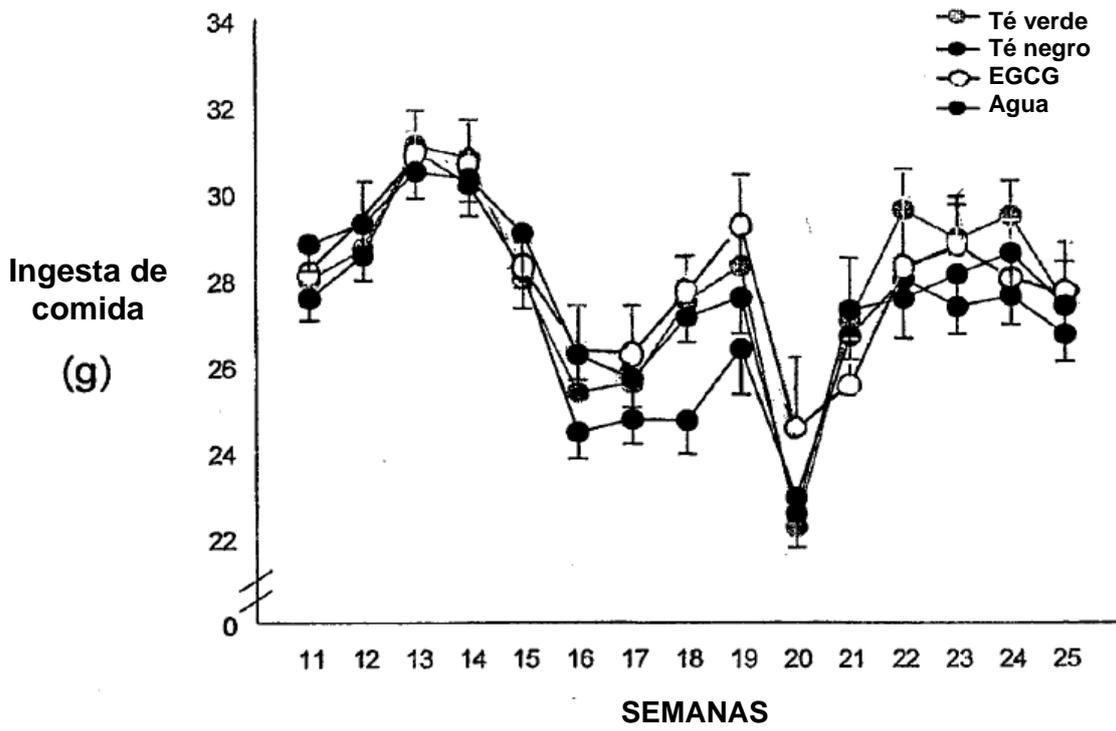


Figura 14

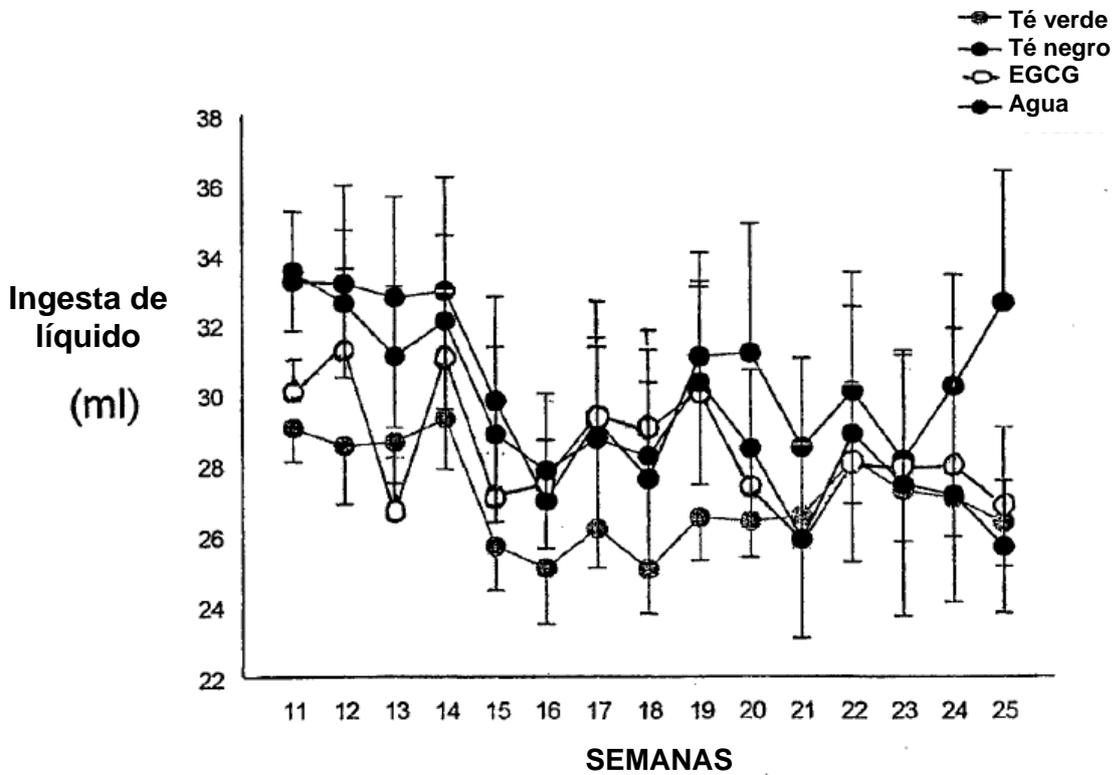


Figura 15

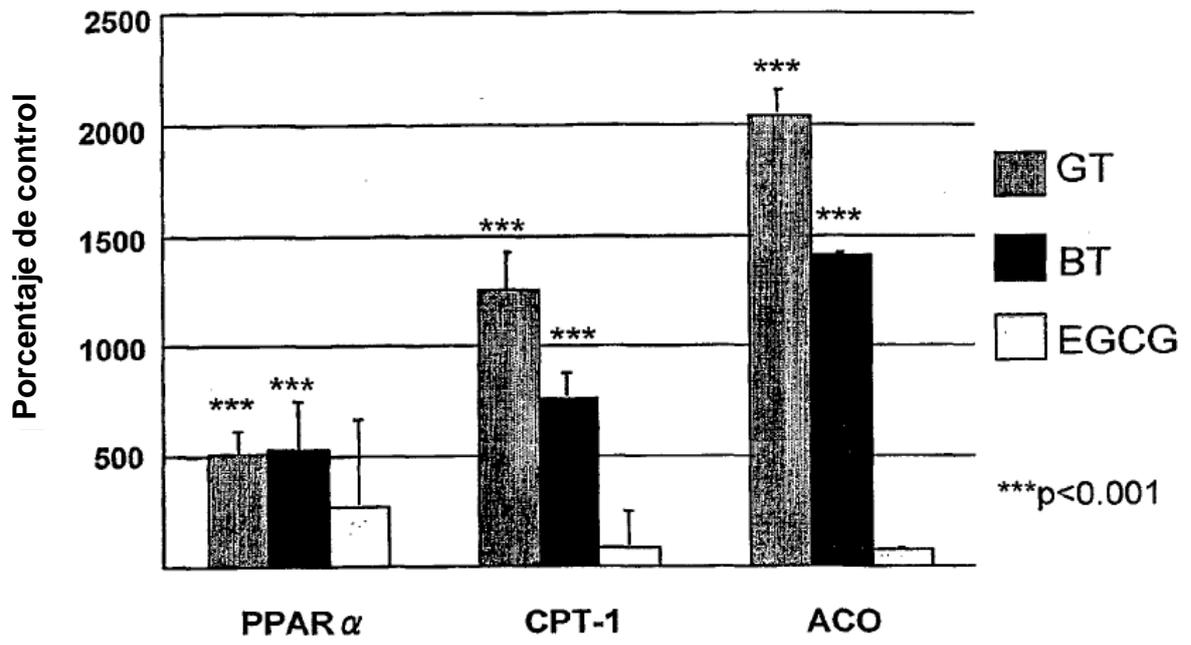


Figura 16

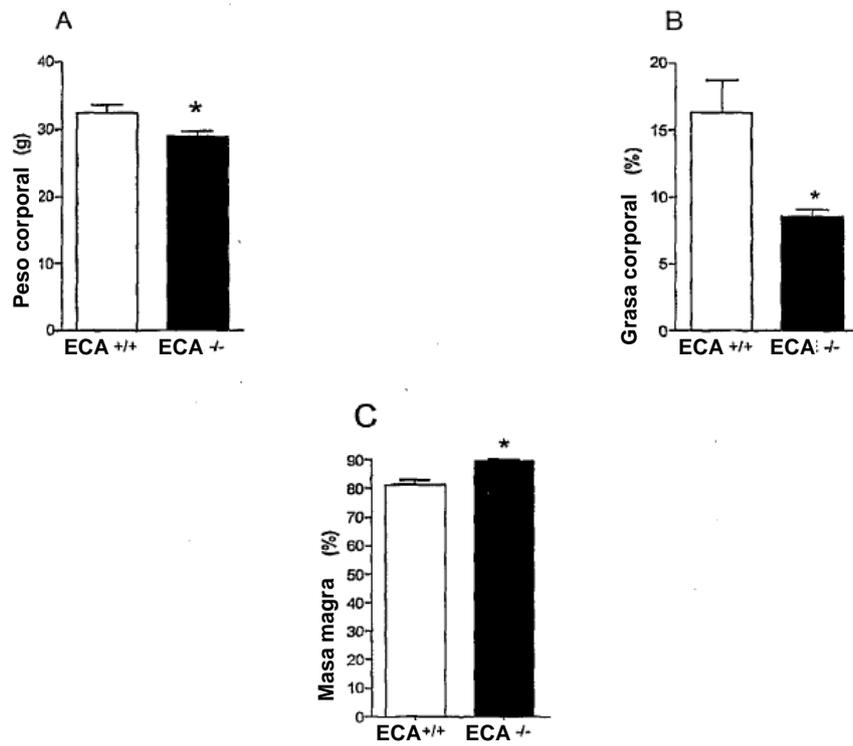


Figura 17

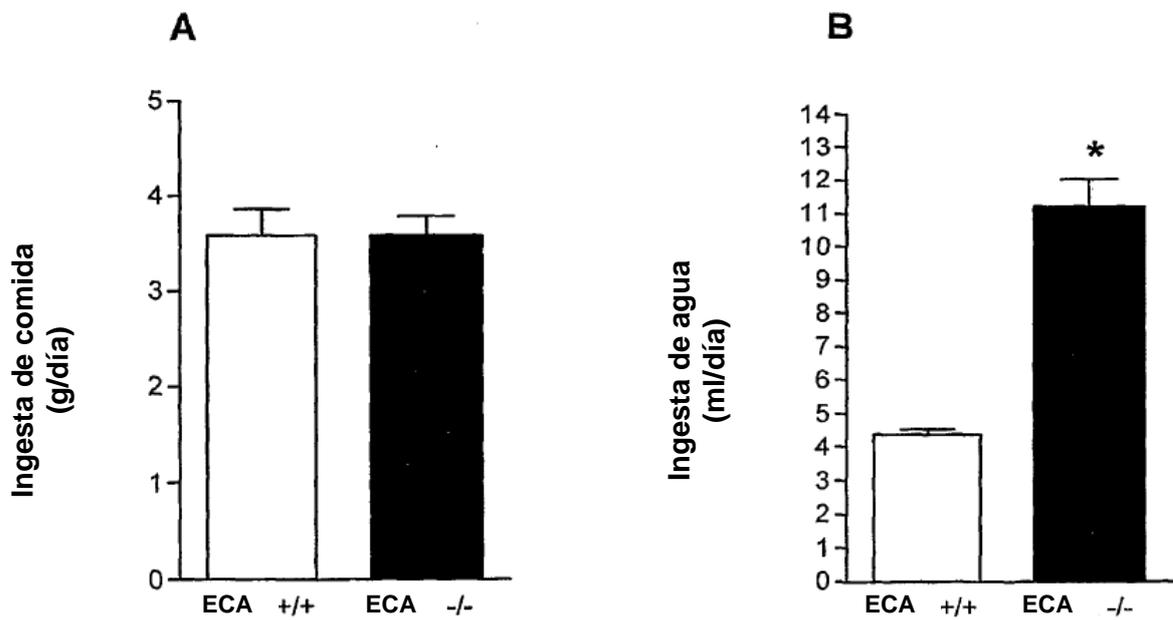


Figura 18

Figure 19

Figure 19

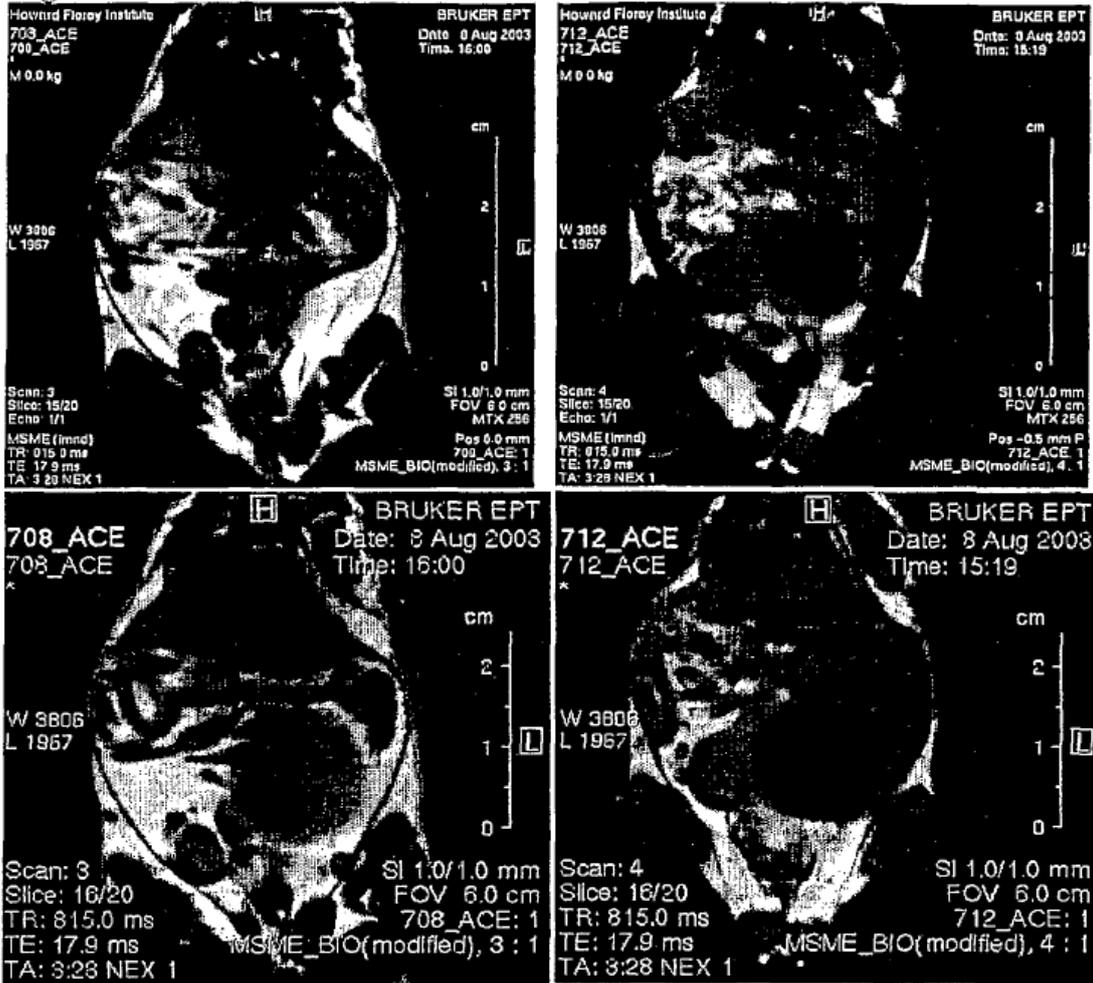


Figura 20

