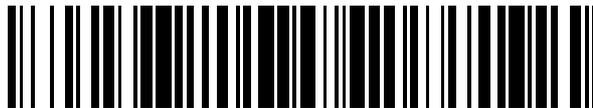


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 889**

21 Número de solicitud: 201431848

51 Int. Cl.:

A61K 36/74 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.12.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.07.2016

Fecha de concesión:

21.04.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

28.04.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070915

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (80.0%)**

C/ Serrano, 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD DE GRANADA (20.0%)

72 Inventor/es:

DEL CASTILLO BILBAO, María Dolores;

FERNÁNDEZ GÓMEZ, Beatriz;

ULLATE ARTIZ, Mónica y

MESA GARCÍA, María Dolores

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE PRODUCTOS DE LA CASCARILLA DE CAFÉ PARA LA PREVENCIÓN Y
TRATAMIENTO DE LAS PATOLOGÍAS QUE CONFORMAN EL SÍNDROME METABÓLICO Y
DE SUS FACTORES DE RIESGO**

57 Resumen:

Uso de productos de la cascarilla de café para la prevención y tratamiento de las patologías que conforman el síndrome metabólico y de sus factores de riesgo.

La presente invención se refiere al uso de productos de la cascarilla de café tostado que debido a su particular composición en ácido clorogénico y cafeína, presentan una importante actividad glucorreguladora y liporreguladora, que los convierten en una excelente alternativa para la prevención y tratamiento del síndrome metabólico, ya que son efectivos simultáneamente ante las principales patologías que lo conforman y sus factores de riesgo.

ES 2 577 889 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

**USO DE PRODUCTOS DE LA CASCARILLA DE CAFÉ PARA LA PREVENCIÓN Y
TRATAMIENTO DE LAS PATOLOGÍAS QUE CONFORMAN EL SÍNDROME
METABÓLICO Y DE SUS FACTORES DE RIESGO**

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA INVENCION

10 La presente invención pertenece al sector de la industria alimentaria y farmacéutica. Más concretamente, se enmarca dentro del campo de los alimentos, de los suplementos alimenticios y de las formulaciones farmacéuticas que comprenden subproductos naturales del café, y que por su actividad liporreguladora y glucorreguladora son útiles para la prevención y tratamiento de las patologías más importantes que conforman el síndrome metabólico y de sus factores de riesgo.

15

ESTADO DE LA TECNICA

20 El síndrome metabólico es una conjunción en un mismo individuo de diversos factores de riesgo, entre los que se encuentran la dislipidemia, la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y la obesidad, que comparten mecanismos patofisiológicos y que con frecuencia se van combinando sucesivamente hasta degenerar en diabetes mellitus tipo 2 y complicaciones cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos (Alegría *et al.* 2008. *Rev Esp Cardiol* 61, 7, 752-64).

25 El tratamiento de las patologías que conforman el síndrome metabólico se lleva a cabo fundamentalmente a través de tratamientos poli-farmacológicos que actúan sobre sus factores de riesgo, e incluyen entre otros glucorreguladores y liporreguladores.

30 El objetivo de los tratamientos glucorreguladores es reducir las cifras de la glucemia basal, la hemoglobina glucosilada –HbA1c- (< 7%) y la glucemia postprandial. Entre los fármacos glucorreguladores más aplicables destacan la acarbosa, el miglitol, la metformina y las glitazonas.

35 La acarbosa (oligosacárido) y el miglitol (monosacárido) son antidiabéticos orales de uso frecuente en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, que inhiben la actividad de la alfa-glucosidasa intestinal, reducen de manera efectiva los niveles de azúcar en sangre

y se utilizan para establecer un mayor control glucémico sobre la hiperglucemia, en particular con respecto a la hiperglucemia postprandial. Sin embargo, pueden provocar efectos secundarios gastrointestinales tales como flatulencia y diarrea.

- 5 El objetivo de los tratamiento liporreguladores es mantener los niveles de lípidos en sangre dentro de los rangos de normalidad (LDL < 100 mg/dl, HDL > 40 mg/dl en hombres y > 50 mg/dl en mujeres y triglicéridos < 150 mg/dl). Un paso esencial en el tratamiento de la dislipidemia en pacientes con obesidad, diabetes y síndrome metabólico es la pérdida de peso, que ha demostrado causar numerosos efectos beneficiosos tales como la mejora del perfil lipídico. Los tratamientos para el control de la obesidad utilizan fármacos como el orlistat que es un inhibidor de la lipasa pancreática que divide triglicéridos en ácidos grasos y monoacilglicerol absorbibles. Otros tratamientos liporreguladores conllevan la administración de estatinas que reducen las cifras de LDL, aunque pueden causar daño hepático, pérdida de memoria, riesgo de diabetes y daño macular; o la administración de fibratos, particularmente el fenofibrato, que se consideran más eficaces que las estatinas para reducir los triglicéridos y aumentar las HDL, debido a su efecto agonista PPAR α , aunque este fármaco puede causar los mismos efectos adversos que otros hipolipemiantes tales como fallo hepático y renal, toxicidad muscular y pancreatitis.
- 10
- 15
- 20 La combinación de varios fármacos en un mismo sujeto implica una importante complejidad derivada de la correcta prescripción y de los posibles efectos adversos cruzados entre tratamientos.

Por otra parte, la prevención de las patologías que conforman el síndrome metabólico y de sus factores de riesgo se lleva a cabo fundamentalmente a través de: a) el mantenimiento de hábitos de vida saludable (por ejemplo con aumento de la actividad física y con disminución en la ingesta calórica); o b) el consumo de alimentos funcionales o suplementos alimenticios que comprenden compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

- 30 Dentro de los alimentos funcionales o suplementos alimenticios, es conocida una formulación que comprende un extracto de dos productos que son la canela y el café, rica en compuestos fenólicos con actividad antioxidante, que según sus inventores provoca un efecto sinérgico que podría dotarlo de capacidad para reducir la incidencia del síndrome metabólico, de las enfermedades asociadas y de sus factores de riesgo (WO2009018648 A1), aunque en el documento en cuestión no se incluyen ejemplos demostrativos.
- 35

También es conocido el uso de un flavonoide presente en un extracto de la planta de rooibos como la aspalatina (WO2008110551 A1), que solo o combinado con otro flavonoide como la rutina con procedencia en la misma planta, provocan una disminución de la glucosa en sangre, motivo por el cual se considera útil para la prevención y tratamiento de la diabetes.

El café suscita un interés creciente en la actualidad debido a los compuestos bioactivos de muy distinta naturaleza que comprenden las distintas partes que lo componen. El fruto del café consiste en una capa fina exterior o pericarpio, usualmente verde en frutos inmaduros pero que luego se torna rojo-violeta o rojo intenso cuando madura. El pericarpio cubre la pulpa o la capa externa del mesocarpio que es amarillento, fibroso y dulce. A continuación del pericarpio hay una capa delgada, traslucida, viscosa y muy hidratada de mucílago. Más internamente hay un pequeño endocarpio amarillento también llamado pergamino. Finalmente, se encuentra la piel de plata, también conocida por *silverskin* o cascarilla de café, cubriendo cada hemisferio de los granos de café (endospermo) (Esquivel *et al.* 2012. *Food Research International* 46, 2, 488–495).

Al consumo moderado de la bebida de café se le asocian potenciales efectos beneficiosos sobre la salud tales como la reducción del nivel de glucosa en plasma y del riesgo de diabetes tipo 2 (Dorea *et al.* 2005. *British Journal of Nutrition* 93, 773-782 y Ranheim *et al.* 2005. *Molecular Nutrition & Food Research* 49, 3, 274–284). Aunque hay indicios que parecen relacionar los anteriormente indicados efectos saludables con la presencia de determinados compuestos en el café, como el ácido clorogénico, otros estudios como el de Tuomlehto *et al.* (2004. *JAMA* 29, 10, 1213-1219) y Pereira *et al.* (2006. *Archives of Internal Medicine* 166, 12, 1311-1316) cuestionan dicha idea e indican que no es posible establecer ninguna relación causal.

Por su parte, Mullen *et al.* (2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 8, 3754-3762) indican que adicionalmente al ácido clorogénico, en el grano de café entero no sometido a tostado se encuentran otros antioxidantes que de forma combinada presentan capacidad para reducir la incidencia de diabetes tipo 2 y el riesgo cardiovascular.

La cascarilla de café constituye el único subproducto del proceso de tostado que tras dicho tratamiento o bien se desecha o bien se utiliza como combustible o fertilizante (Machado *et al.* 2012. *Biochemical Engineering Journal* 60, 87-90).

Se conocen documentos que recomiendan el uso de esta cascarilla de café tostado como alimento funcional debido a su alto contenido en fibra, bajo contenido en grasas y azúcares reductores y marcada actividad antioxidante relacionada con las melanoidinas formadas durante el proceso de tostado del grano (Esquivel *et al.* 2012. *Food Research International* 5 46, 2, 488–495).

Por otra parte, hay trabajos (Murthy *et al.* 2012. *Food and Bioprocess Technology* 5, 3, 897-903) que señalan la presencia de compuestos fenólicos en extractos de la cascarilla de café tostado obtenidos usando un disolvente orgánico como el isopropanol, y que presentan efectos en la reducción de las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres y que según estos mismos autores podrían conferirle actividad antimutagénica, anticarcinogénica, antihiperlipidémica y antioxidante.

También y dentro de la literatura patente, el documento WO2013103465 A1 se refiere a métodos mejorados para producir extractos con sustancias antioxidantes y otros compuestos promotores de la salud a partir del café o subproductos que incluyen la cascarilla y que se obtienen utilizando presiones elevadas, superiores en todo caso a 2000 bar.

Finalmente, el documento WO2013004873 A1 y del que la presente invención reivindica materia inventiva, se refiere a un producto que procede de la cascarilla del café tostado o que es un extracto del mismo y que se caracteriza por comprender unos contenidos mínimos de ácido clorogénico y de cafeína que le confieren actividad antioxidante y que le permite usos relacionados, con la prevención de procesos de envejecimiento fisiológico, de procesos patológicos relacionados con la edad o el estrés oxidativo, y como conservante alimentario.

A mayor abundamiento, estudios posteriores que utilizan el extracto de cascarilla de café que se reivindica en el documento WO2013004873 A1, indican que el consumo de dicho extracto:

- permite una reducción de la acumulación de grasa corporal en *Caenorhabditis elegans*, pero sin establecer ninguna relación con el perfil de lípidos sanguíneo (Martinez-Saez *et al.* 2014. *Food Chemistry* 150, 227-234), y

35

- presenta capacidad para inhibir la formación *in vitro* de productos avanzados de la glicación de proteínas también denominados AGEs (Mesías *et al.* 2014. *Food Research International* 62, 1120-1126). El consumo de AGEs de la dieta y su formación *in vivo* se asocian con desordenes de la salud como las complicaciones de la diabetes, la aterosclerosis y Alzheimer.

En base a lo anterior, se considera de interés la búsqueda de soluciones para la prevención y el tratamiento efectivos de las patologías que conforman el síndrome metabólico y de sus factores de riesgo, a través de fuentes naturales saludables.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

BREVE DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere, a lo largo de diferentes aspectos, al uso de un producto bioactivo que se selecciona de entre,

a) cascarilla tostada del café, o

b) un extracto de cascarilla tostada de café (ECCA) que comprende un mínimo de 80 mg de ácido clorogénico (ACG) y 985 mg cafeína (CF) por cada 100 g de extracto,

en la elaboración de una composición que se selecciona de entre un suplemento alimenticio o una composición farmacéutica y que es útil para la prevención y tratamiento:

- de los factores de riesgo de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se seleccionan de entre hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad,

- de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se seleccionan de entre diabetes y patologías cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos, y

- del síndrome metabólico,

Preferentemente la diabetes es diabetes mellitus tipo 2. También preferentemente, las patologías cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos, son vasculopatías.

- 5 Preferentemente el producto bioactivo es un extracto de cascarilla tostada de café (ECCA), que comprende un mínimo de 80 mg de ácido clorogénico (ACG) y 985 mg cafeína (CF) por cada 100 g de extracto, y que se obtiene por extracción con 2 volúmenes de agua por cada parte de cascarilla, a una temperatura de 100 °C durante un mínimo de 10 minutos.
- 10 En otros aspectos, la invención se refiere al suplemento alimenticio, o a la composición farmacéutica que comprende al producto bioactivo y que son útiles para la prevención y tratamiento de las patologías que conforman el síndrome metabólico, de sus factores de riesgo y del síndrome metabólico.
- 15 En un último aspecto, la invención también se refiere al uso del producto bioactivo como coadyuvante tecnológico para reducir el índice glucémico en un alimento.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

- 20 El problema técnico que resuelve la presente invención es la búsqueda de una alternativa para la prevención y tratamiento de las principales patologías de un desorden multifactorial como el síndrome metabólico y de sus factores de riesgo, utilizando un producto natural, en este caso el producto derivado de la cascarilla del café que se reivindica en la solicitud WO2013004873 A1 publicada con fecha 3 de enero de 2013 (con origen en la solicitud de
- 25 prioridad ES2012/070490 de fecha 4 de julio 2011), en adelante producto bioactivo de la invención.

En el presente documento por “producto bioactivo de la invención” se entiende indistintamente:

- 30
- a) la cascarilla tostada del café, o
 - b) un extracto de cascarilla tostada de café (ECCA) que comprende un mínimo de 80 mg de ácido clorogénico (ACG) y 985 mg cafeína (CF) por cada 100 g de extracto.

35

La cascarilla tostada del café del apartado a) es la cascarilla en polvo o la cascarilla de café entera de variedades como, por ejemplo y sin limitarse, Arábica, Robusta o sus mezclas y que han sufrido un proceso de tostado.

5 El extracto de cascarilla tostada de café del apartado b), es el producto del apartado a) que se somete a una extracción que puede tener lugar mediante hidrólisis enzimática, ruptura celular empleando procedimientos mecánicos a temperatura ambiente, extracción con agua caliente, o extracción con el empleo de condiciones de agua subcrítica y/o supercrítica. Preferentemente la extracción se lleva a cabo con:

10

i) 2 volúmenes de agua por cada parte de cascarilla, a una temperatura de 100°C durante un mínimo de 10 minutos, o

15

ii) con agua subcrítica a temperaturas comprendidas entre 50 y 200°C, manteniendo un tiempo de extracción estático constante de 20 minutos y una presión de entre 103 y 207 psi, preferentemente 103 bar.

La cascarilla de café cuando está en forma de polvo se obtiene con ayuda de un molino y empleando nitrógeno líquido para evitar modificaciones de sus compuestos bioactivos.

20

La presente invención se basa en la observación de que la administración de una dosis de 140 mg/kg/día de extracto de cascarilla tostada de café que comprende un mínimo de 80 mg de ácido clorogénico y 985 mg cafeína por cada 100 g de extracto durante un período mínimo de 35 días en un modelo de ratas Wistar adultas en las que se induce diabetes mellitus tipo 2, produce simultáneamente efecto glucorregulador, hipoglucemiante y antidiabetogénico (ver ejemplos 3.1, 3.2, 3.3, 3.5, 3.6 y 3.7), efecto liporregulador (ver ejemplos 3.8, 3.9 y 3.10) y disminuye la resistencia a la insulina (ver ejemplo 3.4).

25

Adicionalmente, el extracto de cascarilla tostada de café también presenta capacidad hipoglucemiante y mejoradora de la tolerancia oral a la glucosa de forma significativamente estadística en un modelo de ratas Wistar adultas sanas cuando se administra conjuntamente con una carga de glucosa (ver ejemplo 2).

30

Los efectos anteriormente reseñados, y que tienen su base en la especificidad de la composición, sientan las bases para el uso del producto bioactivo de la invención en la prevención y tratamiento de la diabetes y de patologías cardiovasculares asociadas a

35

cambios en el patrón de los lípidos séricos y de sus factores de riesgo, y por ende del síndrome metabólico.

5 Por "síndrome metabólico" se entiende un desorden multifactorial en el que confluyen varios factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer determinadas patologías como enfermedades cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos o diabetes mellitus. Tanto las patologías como los factores de riesgo pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo y permiten identificar este síndrome, además están directamente interrelacionadas, de tal modo que comparten mecanismos de aparición y evolución y con frecuencia se van combinando sucesivamente. Factores de riesgo que se incluyen dentro del ámbito de esta invención son, hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad.

15 Se entiende por "diabetes mellitus" o "diabetes" una enfermedad o afección que se caracteriza generalmente por anomalías metabólicas en la producción y utilización de glucosa que resulta en la ineficacia para mantener los niveles de azúcar en sangre dentro del rango de normalidad. El resultado de estas anomalías es glucosa en sangre elevada que se denomina "hiperglucemia." Las dos formas principales de diabetes son diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. La diabetes tipo 1 es generalmente el resultado de un fallo en el páncreas que deriva en una falta de producción absoluta de insulina, la hormona que regula la entrada de la glucosa por las células. La diabetes tipo 2 puede presentar niveles normales o incluso elevados de insulina y puede ser resultado de la incapacidad de los tejidos para responder de forma apropiada a la insulina. La mayoría de los pacientes diabéticos tipo 2 son resistentes a la insulina y tienen una deficiencia relativa de insulina, que consiste en que la secreción de insulina no puede compensar la resistencia de los tejidos periféricos a responder a la insulina. Los pacientes diabéticos tipo 2, con frecuencia, son obesos. Otros tipos de trastornos de la homeostasis de la glucosa incluyen intolerancia a la glucosa que es una etapa metabólica intermedia entre la homeostasis de la glucosa normal y la diabetes. La diabetes mellitus es un síndrome orgánico multisistémico que tiene como característica el aumento de los niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia, resultado de efectos en la secreción de insulina, en su acción o ambos. Se trata de una compleja enfermedad en la que coexiste un trastorno global del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Es multifactorial por la existencia de múltiples factores implicados en su patogénesis.

35 Se entiende por "enfermedad cardiovascular asociada a cambios en el patrón de los lípidos séricos" preferentemente a las vasculopatías, inicialmente subclínicas y finalmente

manifiestas en forma de complicaciones aterotrombóticas que tienen lugar como consecuencia del cambio del metabolismo de los lípidos asociado a la diabetes y síndrome metabólico.

- 5 Por “hiperglucemia” se entiende niveles elevados de glucosa en sangre. Por “resistencia a la insulina” se entiende niveles elevados de insulina en sangre. Por “dislipidemia” se entiende elevados niveles de colesterol (hipercolesterolemia), triglicéridos (hipertrigliceridemia), lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) en plasma. Por “obesidad” se entiende un exceso de adiposidad corporal que se
- 10 determina en base al índice de masa corporal (IMC >30) en individuos metabólicamente sanos y enfermos. Se incluye además en este concepto al fenotipo correspondiente a individuos con peso normal pero metabólicamente obesos; es decir, tienen un IMC normal pero presentan alteraciones típicas de los pacientes obesos: resistencia a la insulina, adiposidad central, bajas cifras de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y
- 15 elevadas concentraciones de triglicéridos, así como hipertensión arterial (HTA).

La resistencia a la insulina implica que los tejidos del cuerpo se vuelven insensibles a los efectos de la insulina, por lo que la glucosa no puede entrar en las células y se acumula en sangre. Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y los intolerantes a la glucosa sufren

20 resistencia a la insulina. Inicialmente la resistencia a la insulina es moderada y la intolerancia a la glucosa es asimétrica pero conlleva un riesgo muy alto de desarrollar diabetes tipo 2 en el futuro. La intolerancia a la glucosa puede durar 7-10 años antes de que aparezca la diabetes tipo 2.

25 La principal ventaja técnica de la presente invención estriba en la utilización de un producto bioactivo obtenido a partir de un único material residual que es la cascarilla de café, y que permite actuar simultáneamente frente a las patologías que conforman el síndrome metabólico y sus factores de riesgo.

30 Aunque son conocidos los efectos beneficiosos del consumo de la bebida del café sobre alteraciones como el nivel de glucosa en plasma, la diabetes tipo 2 o el riesgo cardiovascular, como ya se ha indicado en el estado de la técnica, el grano de café está conformado por múltiples partes que se caracterizan por comprender muy diversos compuestos que pueden ser o no ser bioactivos.

35

Por otra parte, los procedimientos de obtención de extractos influyen de forma determinante sobre los compuestos que se trasladan a dicho extracto, de tal modo que el solvente utilizado y las condiciones de extracción (temperatura, presión, etc.) hacen que los extractos presenten composiciones diferentes, con distintas concentraciones de los compuestos bioactivos y con formas más o menos activas de los compuestos.

Finalmente, es también necesario considerar que el proceso de tostado tiene un efecto dramático en la composición de las diferentes partes del café y especialmente de la cascarilla de café.

Los resultados que se incluyen en los ejemplos de este documento, en los que se muestra también la actividad del ácido clorogénico y de la cafeína utilizados de forma aislada, inciden en que los efectos más beneficiosos sobre los distintos factores de riesgo y patologías se obtienen de forma simultánea, únicamente cuando se utiliza el producto bioactivo de la invención, no siendo así cuando se utiliza el ácido clorogénico en distintas dosis o la cafeína. En base a lo anterior se infiere que la efectividad del producto bioactivo de la invención probablemente se derive de la proporción de compuestos bioactivos (cafeína y ácido clorogénico), pero probablemente también de otros componentes como la fibra dietética que se derivan de su procedimiento de obtención.

En un primer aspecto, la invención se refiere al uso del producto bioactivo de la invención en la elaboración de un suplemento alimenticio útil para la prevención de al menos un factor de riesgo de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se selecciona de entre hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad, o de todos ellos de forma simultánea.

En la presente invención, por "suplemento alimenticio" se entiende un producto destinado a complementar la alimentación y cuya finalidad es incrementar la ingesta dietética total, complementarla, suplir algún componente o prevenir patologías. En la presente invención se entiende que el suplemento alimenticio puede presentar distintas formas de administración, incluyendo por ejemplo la forma galénica a través de un producto nutracéutico.

Por "prevención" se entiende cualquier actuación que tenga un efecto directo sobre los factores de riesgo que pueden desencadenar en alguna patología, antes de que sean efectivos, pero también que mejore el estado de salud global, evitando que dichos factores de riesgo lleguen a desarrollarse.

En una realización particular del primer aspecto de la invención, el suplemento alimenticio adicionalmente es útil para la prevención de al menos una de las patologías que conforman el síndrome metabólico, que se seleccionan de entre diabetes y patologías cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos, o de ambas de forma simultánea.

5 Preferentemente las patologías son diabetes y vasculopatías. Más preferentemente la diabetes es diabetes mellitus tipo 2.

En otra realización más particular del primer aspecto de la invención, el suplemento alimenticio adicionalmente es útil para la prevención del síndrome metabólico.

10

En un segundo aspecto, la invención se refiere al suplemento alimenticio, en adelante suplemento alimenticio de la invención, que comprende al producto bioactivo de la invención y que es útil para la prevención de las patologías que conforman el síndrome metabólico, de sus factores de riesgo y del síndrome metabólico, tal y como se define en el presente documento.

15

Adicionalmente, el suplemento alimenticio de la invención puede comprender al menos otro principio activo. Los principios activos que se incluyen en el ámbito de la presente invención son principios de origen natural o sintético que incrementan la actividad preventiva del suplemento alimenticio con respecto al síndrome metabólico, a las patologías que lo conforman o a sus factores de riesgo.

20

El suplemento alimenticio de la invención se puede consumir normalmente por vía oral, por ejemplo en forma de comprimidos, cápsulas, granulados, líquidos, polvos, en forma liofilizada, en forma de gel, soluciones, suspensiones o cualquier otra forma de presentación adecuada.

25

Por "alimento enriquecido" se entiende cualquier combinación de ingredientes constitutiva de un producto alimentario sólido o líquido que comprende un producto enriquecido en ácido clorogénico y cafeína tal y como se define según cualquiera de los apartados a) y b) de la definición de producto bioactivo de la invención, que adicionalmente a sus características nutricionales, tiene funciones específicas que ayudan a mejorar el estado de salud global y prevenir el riesgo de contraer el síndrome metabólico, las patologías que lo conforman o sus factores de riesgo

35

En el ámbito del presente documento, el alimento enriquecido y el suplemento alimenticio de la invención se pueden utilizar directamente, o como ingrediente de otro alimento que lo comprende.

5 En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso del suplemento alimenticio de la invención o del alimento enriquecido para la prevención de al menos uno de los factores de riesgo de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se seleccionan de entre hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad, o de todos ellos de forma simultánea.

10

En una realización particular de tercer aspecto de la invención, el suplemento alimenticio de la invención o el alimento enriquecido, adicionalmente son útiles para la prevención de al menos una de las patologías que conforman el síndrome metabólico, que se seleccionan de entre diabetes y patologías cardiovasculares asociada a cambios en el patrón de los lípidos séricos, o de ambas de forma simultánea. Preferentemente las patologías son diabetes y vasculopatías. Más preferentemente la diabetes es diabetes mellitus tipo 2.

15

En otra realización más particular del tercer aspecto de la invención, el suplemento alimenticio de la invención o el alimento enriquecido, adicionalmente son útiles para la prevención del síndrome metabólico.

20

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso del producto bioactivo de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica.

25 En un quinto aspecto, la invención se refiere al uso del producto bioactivo en la elaboración de una composición farmacéutica que es útil para la prevención y tratamiento de al menos uno de los factores de riesgo de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se selecciona de entre hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad, o de todos ellos de forma simultánea.

30

En una realización particular del quinto aspecto de la invención, la composición farmacéutica adicionalmente es útil para la prevención y tratamiento de al menos una de las patologías que conforman el síndrome metabólico, y que se seleccionan de entre diabetes y patologías cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos, o de ambas de forma simultánea. Preferentemente las patologías son diabetes y vasculopatías. Más preferentemente la diabetes es diabetes mellitus tipo 2.

35

En otra realización más particular del quinto aspecto de la invención, la composición farmacéutica adicionalmente es útil para la prevención y tratamiento del síndrome metabólico.

- 5 En un sexto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende el producto bioactivo de la invención para su uso en terapia.

Preferentemente la composición farmacéutica de la invención es eficaz para la prevención y
10 tratamiento del síndrome metabólico, de al menos una de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se seleccionan de entre diabetes y patologías cardiovasculares asociada a cambios en el patrón de los lípidos séricos, o de ambas de forma simultánea. Preferentemente las patologías son diabetes y vasculopatías. Más preferentemente la diabetes es diabetes mellitus tipo 2. También preferentemente, los factores de riesgo de las
15 patologías que conforman el síndrome metabólico, y contra las que es efectiva la composición farmacéutica de la invención, se seleccionan de entre hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad, o son todos ellos de forma simultánea.

En realizaciones particulares del sexto aspecto de la invención, las composiciones
20 farmacéuticas que se incluyen en el ámbito de esta invención adicionalmente utilizan al menos un excipiente, un adyuvante y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

En la presente invención se entiende por “excipiente” a una sustancia inactiva usada para incorporar el producto bioactivo de la invención. Además puede ser usado para ayudar al
25 proceso mediante el cual la composición es manufacturada. Ejemplos de excipientes incluyen sin limitar a, aglutinantes (mantienen los ingredientes de una tableta unidos, tales como hidroxipropil, celulosa, xilitol, sorbitol, manitol, etc.), diluyentes (rellenan el contenido de una pastilla o cápsula, tales como, celulosa vegetal, fosfato cálcico dibásico, flor de cártamo, etc.), desintegradores (compuestos que se expanden y disuelven cuando se les
30 moja causando que la tableta se rompa cuando llegue al tracto digestivo y libere los principio activos para su absorción), lubricantes (previenen que los ingredientes se agrupen en terrones, tales como talco, sílica, etc.), recubridores (protegen a los ingredientes de la tableta de los agentes externos, tales como celulosa, polímeros sintéticos, polisacáridos, etc.), edulcorantes, saborizantes y colorantes.

35

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte con la finalidad de facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

5

10

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc.

15

La composición farmacéutica de la invención puede estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensoactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, o en cualquier libro de similares características que exista en cada país.

20

25

30

En realizaciones adicionales del sexto aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas que se incluyen en el ámbito de esta invención comprenden al menos otro principio activo. Los principios activos que se incluyen en el ámbito de la presente invención son principios de origen natural o sintético que incrementan la actividad de la composición farmacéutica de la invención, preferentemente con respecto al tratamiento de las patologías del síndrome metabólico, de sus factores de riesgo o del síndrome metabólico.

35

En el ámbito de la presente invención se incluye el uso del producto bioactivo de la invención y de la composición farmacéutica de la invención para la prevención y tratamiento de las patologías que conforman el síndrome metabólico de sus factores de riesgo y del síndrome metabólico, tal y como se define en el presente documento.

5

También se incluye dentro del ámbito de la presente invención cualquier método de prevención y tratamiento de las patologías que conforman el síndrome metabólico, de sus factores de riesgo y del síndrome metabólico, tal y como se define en el presente documento, que consiste en la administración de una dosis efectiva del producto bioactivo o de la composición farmacéutica de la invención.

10

En la presente invención se entiende por “método de tratamiento” al conjunto de medios que se emplean en un sujeto para prevenir, aliviar o curar una enfermedad, o para eliminar o disminuir los síntomas de una enfermedad. En la presente invención se entiende por “individuo” o “sujeto” a un miembro de una especie animal, preferentemente mamífero e incluye, pero no se limita a, un animal doméstico, un primate y un humano; en el contexto de la presente invención, el individuo es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier raza o edad.

15

La dosificación del producto bioactivo, del suplemento alimenticio de la invención, del alimento enriquecido y de las composiciones farmacéuticas de la invención, variará dependiendo de numerosos factores, como la edad, severidad de la patología, vía de administración y frecuencia de la dosis.

20

Las características del producto bioactivo de la invención también permiten su utilización como coadyuvante tecnológico en la preparación de alimentos un reducido índice glucémico.

25

Se entiende por coadyuvante tecnológico toda sustancia que no se consuma como alimento en sí misma, si no que se utilice intencionadamente en la transformación de materias primas, alimentos o sus ingredientes para cumplir un determinado propósito tecnológico durante el tratamiento o la transformación, y pueda dar lugar a la presencia involuntaria, pero técnicamente inevitable, en el producto final de residuos de la propia sustancia o de sus derivados, a condición de que no presenten ningún riesgo para la salud y no tengan ningún efecto tecnológico en el producto final.

30

35

En un séptimo aspecto, la invención se refiere al uso del producto bioactivo de la invención como coadyuvante tecnológico que favorece un reducido índice glucémico en un alimento.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Prueba de tolerancia oral a la glucosa en ratas Wistar sanas. La glucosa se administró de forma simultánea con ácido clorogénico, cafeína o extracto de cascarilla tostada de café. (A) Resultados obtenidos a los tiempos 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración oral de glucosa conjuntamente con los distintos tratamientos. (B) Detalle de los resultados anteriores a los 30 minutos. Los dos paneles (A) y (B) muestran la media de los valores de glucosa en sangre total (mg/dl) obtenidos a diferentes tiempos de análisis \pm error estándar de la media (EEM) (n=12 por tratamiento) según el ejemplo 2. La comparación de las medias se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni. Letras distintas muestran diferencias significativas con $p < 0,05$.

Figura 2. Porcentaje promedio de reducción y aumento de los niveles de glucosa en sangre total durante los 6 días posteriores a la inducción de diabetes a través de una dosis única de streptozotocina (STZ) y nicotinamida por vía intraperitoneal en ratas Wistar sometidas a pretratamientos con ácido clorogénico, cafeína y extracto de cascarilla tostada de café. Los valores de los porcentajes se calcularon empleando como referencia las ratas a las que se les indujo químicamente diabetes sin haberseles aplicado pretratamiento previo (control II) utilizando la media de los valores de glucosa en sangre total \pm el error estándar de la media (EEM) (n=8 por tratamiento) según el ejemplo 3.1. La comparación de las medias se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni. Letras distintas muestran diferencias significativas con $p < 0,05$.

30

Figura 3. Prueba de tolerancia oral a la glucosa en ratas Wistar sometidas a pretratamientos con ácido clorogénico, cafeína y extracto de cascarilla tostada de café, 3 días después de inducirles diabetes a través de una dosis única de streptozotocina (STZ) y nicotinamida por vía intraperitoneal. La figura muestra los valores del área bajo la curva (AUC) obtenidos por representación gráfica de los valores de glucosa en sangre total según el ejemplo 3.2. Las barras representan la media del AUC y las barras de error el EEM (n=8 por tratamiento). La comparación de las medias se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía y prueba T3 de Dunnett. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

10

Figura 4. Efecto antidiabetogénico en ratas Wistar sometidas a pretratamientos con ácido clorogénico, cafeína y extracto de cascarilla tostada de café, tras 8 días de haberse inducido la diabetes a través de una dosis única de streptozotocina (STZ) y nicotinamida por vía intraperitoneal. La gráfica muestra el porcentaje de animales que presentaron hiperglucemia permanente (diabetes) en cada grupo de tratamiento (n=8 por tratamiento) según el ejemplo 3.3 tomando como criterios diagnósticos hiperglucemia permanente (>110 mg/dl en ayunas) y baja tolerancia a la glucosa (>200 mg/dl a las 90 y 120 min de ingesta).

Figura 5. Capacidad de inhibición *in vitro* de la actividad de la α -glucosidasa intestinal del ACG y el extracto de cascarilla tostada de café. La gráfica muestra los valores de IC50 (mg/ml) obtenidos para ACG y extracto de cascarilla tostada de café según el ejemplo 3.5.

Figura 6. Efecto sobre el peso corporal en ratas Wistar sometidas a pretratamientos con ácido clorogénico, cafeína y extracto de cascarilla tostada de café, tras 8 días de haberse inducido diabetes a través de una dosis única de streptozotocina (STZ) y nicotinamida por vía intraperitoneal. La gráfica muestra el peso final de los animales según el ejemplo 3.6 al final del estudio. Las barras representan la media y las barras de error el EEM (n=8 por tratamiento). La comparación de las medias se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 7. Efecto sobre el peso relativo del hígado (peso hígado/peso final) en ratas Wistar sometidas a pretratamientos con ácido clorogénico, cafeína y extracto de cascarilla tostada de café, tras 8 días de haber inducido diabetes a través de una

dosis única de streptozotocina (STZ) y nicotinamida por vía intraperitoneal en ratas Wistar. La gráfica muestra los pesos relativos del hígado de los animales tras la suplementación con los distintos compuestos o con el extracto según el ejemplo 3.7. Las barras representan la media y las barras de error el EEM (n=8 por tratamiento). Las comparaciones de las medias se llevaron a cabo mediante ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni. Letras distintas muestran diferencias significativas con $p < 0,05$.

Figura 8. Efecto sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol total en ratas Wistar sometidas a pretratamientos con ácido clorogénico, cafeína y extracto de cascarilla tostada de café, tras 8 días de haberse inducido diabetes a través de una dosis única de streptozotocina (STZ) y nicotinamida por vía intraperitoneal en ratas Wistar. La gráfica muestra las concentraciones de colesterol total en plasma según el ejemplo 3.8. Las barras representan la media y las barras de error el EEM. Las comparaciones de las medias se llevaron a cabo mediante ANOVA de una vía y prueba T3 de Dunnett. Letras distintas muestran diferencias significativas con $p < 0,05$.

Figura 9. Efecto sobre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos en ratas Wistar sometidas a pretratamientos con ácido clorogénico, cafeína, y extracto de cascarilla tostada de café, tras 8 días de haberse inducido diabetes a través de una dosis única de streptozotocina (STZ) y nicotinamida por vía intraperitoneal en ratas Wistar. La gráfica muestra las concentraciones de triglicéridos en plasma según el ejemplo 3.9. Las barras representan la media y las barras de error la EEM. Las comparaciones de las medias se llevaron a cabo mediante ANOVA de una vía y prueba T3 de Dunet. Letras distintas muestran diferencias significativas con $p < 0,05$.

25

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A) OBTENCION DEL EXTRACTO

30 Ejemplo 1. Obtención del extracto de cascarilla tostada de café (ECCA)

El extracto se obtuvo a partir de cascarilla de café generada como subproducto del tostado de granos de café verde Arábica. Se preparó empleando 250 mg de dicha cascarilla y 500 ml de agua. La extracción se realizó a 100 °C durante 10 min. El extracto así obtenido se centrifugó, se colectó el sobrenadante y se liofilizó para obtener extracto en polvo. El producto así obtenido se almacenó a temperatura ambiente en un lugar seco hasta su uso.

35

B) ENSAYOS EN RATAS SANAS**Ejemplo 2. Efecto sobre la tolerancia a la glucosa de los componentes del café y el extracto de cascarilla tostada de café en ratas Wistar sanas**

5

Se empleó un grupo de 12 ratas macho Wistar adultas de entre 150-200 g de peso. Tras un periodo de ayuno de 14 horas se les aplicó una única dosis de los tratamientos que se detallan a continuación empleando una sonda nasofaríngea rígida:

- glucosa 2 g/kg peso (grupo control)
- 10 • glucosa 2 g/kg peso y ácido clorogénico (ACG-1,5) 1,5 mg/kg peso
- glucosa 2 g/kg peso y ácido clorogénico (ACG-10) 10 mg/kg peso
- glucosa de 2 g/kg peso y cafeína (CF) 5 mg/kg peso
- glucosa de 2 g/kg peso y extracto de cascarilla tostada de café (ECCA) 140 mg/kg peso

15

A cada una de las 12 ratas se les aplicó de forma secuencial cada uno de los tratamientos anteriores, empleando un lavado de 3 días entre cada tratamiento para garantizar que se metabolizaran totalmente los compuestos bioactivos y evitar interferencias. En todo caso, la dosis se indica con respecto al peso en kilogramos del animal sometido a tratamiento.

20

Las concentraciones de glucosa en sangre (mg/dl) se determinaron a los 0, 30, 60 y 120 min usando un glucómetro (*FreeStyle Freedom Lite®*, *Abbot Laboratories*) cuya medición se basa en el método de la glucosa oxidasa, mediante una punción en la cola. Los niveles de glucosa en sangre total de los animales tratados con ACG, CF y extracto de cascarilla tostada de café (ECCA) fueron menores que los detectados en animales control durante los 25 90 min después de la ingesta (ver figura 1A).

Cabe destacar que a los 30 min de ingesta los niveles de glucosa en sangre total de las ratas tratadas con extracto de cascarilla tostada de café fueron significativamente ($p < 0,05$) 30 más bajos en comparación con los niveles de glucosa en el grupo control (ver figura 1B).

Los resultados indican un efecto hipoglucemiante del extracto de cascarilla tostada de café en individuos sanos y una mejora de la tolerancia a la glucosa.

35

C) ENSAYOS EN RATAS ENFERMAS

Se emplearon ratas macho Wistar adultas de entre 150-200 g de peso. Los tratamientos y dosis que se detallan a continuación fueron administrados empleando una sonda nasofaríngea rígida durante 35 días y un total de 8 ratas por tratamiento:

- no tratadas (grupo control I: sanas)
- no tratadas (grupo control II: enfermas)
- cafeína (CF) 5 mg/kg peso/día
- 10 • ácido clorogénico (ACG) 1,5 mg/kg peso/día
- ácido clorogénico (ACG) 10 mg/kg peso/día
- extracto de cascarilla tostada de café (ECCA) (140 mg/kg peso/día)

En el caso de los grupos control se suministró una dosis de 1 ml de agua. Después de los 15 35 días de pretratamiento se indujo la diabetes por inyección intraperitoneal de los agentes estreptozotocina (STZ) (65 mg/kg peso) y nicotinamida (250 mg/kg de peso), en todos los grupos a excepción del grupo control I, continuándose con el tratamiento durante 8 días más, momento en cual las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas.

20 La STZ es una sustancia con citotoxicidad específica que destruye células β y causa un estado de deficiencia primaria de insulina en una dosis en ciertas especies animales como las ratas Wistar y diabetes permanente (hiperglucemia) sin causar daños en otros órganos. La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad de la STZ. El uso combinado de ambos compuestos químicos permite lograr un estado de hiperglucemia y resistencia a la 25 insulina, del mismo modo que sucede en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Se empleó como anestésico ketamina-xilacina en una dosis de 1 ml/kg de ketamina y 0,5 ml/kg de Xilacina por vía intraperitoneal. Los animales se mantuvieron tranquilos durante 3 min en oscuridad para favorecer el efecto de la anestesia. Cuando los animales no 30 presentaban reflejo en la retracción de la extremidad seguida de la relajación de los músculos abdominales, se les extrajo la sangre mediante una punción en el corazón que se recogió en tubos con EDTA y se centrifugó inmediatamente (1800 x g durante 15 min a 4 °C) para obtener muestras de plasma. El hígado se diseccionó, se lavó en solución salina enfriada con hielo para eliminar la sangre, se pesó y se congeló rápidamente en nitrógeno 35 líquido. El plasma y el hígado se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

EFEECTO GLUCORREGULADOR Y ANTIDIABETOGÉNICO

Las ratas tratadas tal y como se indica en el apartado C), fueron objeto de un seguimiento de la respuesta clínica mediante análisis diario de los niveles de glucosa en sangre total después de un ayuno de 12 h. La determinación de la glucosa en sangre se realizó con un glucómetro (*FreeStyle Freedom Lite®*, *Abbot Laboratories*) mediante punción en la cola.

Ejemplo 3.1. Respuesta clínica a la inducción química de la diabetes durante los 6 días posteriores

Los niveles de glucosa en ratas enfermas tratadas con ACG, CF y extracto de cascarilla tostada de café mostraron un comportamiento distinto que las ratas sometidas al agente químico inductor de la patología (control II). No se detectó la fase clínica de hipoglucemia, característica del modelo empleado, en ningún grupo de animales tratados con componentes del café y extracto de cascarilla tostada de café. En consecuencia los niveles de glucosa tras 24 h de inducción de la enfermedad fueron porcentualmente más elevados en los animales tratados y sanos (control I) comparativamente a los detectados en el grupo control II. Los tratamientos con ACG 1,5 mg/kg y cascarilla de café 140 mg/kg causaron una reducción mayor del 30 % de los niveles de glucosa en sangre total después de 24 h de la inyección de STZ/nicotinamida y durante los 6 días siguientes de evolución de la enfermedad (figura 2).

Ejemplo 3.2. Tolerancia a la glucosa a los 3 días de la inducción de la diabetes

A los tres días de inducción química de la patología se realizó un análisis de tolerancia oral a la glucosa (PTGO) para confirmar el diagnóstico de la enfermedad por disminución de la tolerancia a la glucosa oral y para ello se procedió tal y como se indica en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en la figura 3. Por otra parte, los valores de glucosa en sangre total de ratas tratadas con una dosis de ACG de 1,5 mg/kg o una dosis de 140 mg/kg de cascarilla de café fueron inferiores a los 200 mg/ml en todos los tiempos ensayados y más bajos que los encontrados en las ratas a las que se les indujo la diabetes y no se les suministró ningún tratamiento de prevención de la enfermedad (control II). La tolerancia de la glucosa en las ratas sometidas a estos tratamientos no fue significativamente distinta ($p > 0,05$) a la detectada en los animales que no se sometieron a inducción química de la diabetes (ratas sanas).

Ejemplo 3.3. Efecto antidiabetogénico 8 días después de la inducción de la diabetes

Al finalizar el ensayo tal y como se expone en el apartado C), y siguiendo los criterios diagnósticos de manifestación de hiperglucemia permanente (>110 mg/dl en ayunas) y baja tolerancia a la glucosa (>200 mg/dl a las 90 y 120 min de ingesta) el 37,5% de los animales tratados con el agente inductor enfermaron (ver figura 4). Estos resultados que se expresan como porcentaje indican una prevención del efecto diabetogénico de la STZ por dosis de ACG 1,5 mg/kg y extracto de cascarilla tostada de café 140 mg/kg, reduciendo la efectividad del agente químico inductor de la diabetes en un 70% en ambos grupos.

10

Ejemplo 3.4. Efecto sobre los índices de sensibilidad a la insulina 8 días después de la inducción de la diabetes

Al finalizar el ensayo tal y como se expone en el apartado C, los niveles de glucosa en plasma se determinaron utilizando un kit comercial (*Spinreact*, S.A./S.A.U, Sant Esteve de Bas, España; Ref. 1001190) que se basa en el método de la glucosa oxidasa. La insulina en plasma se determinó por kit ELISA (*Mercodia A.B, Uppsala, Sweden*; Ref. 10-1250-01).

15

La evaluación del modelo homeostático o índice HOMA de resistencia a la insulina (HOMA-IR), de la función de las células beta (HOMA-β), y el índice de sensibilidad a la insulina (QUICKI) se calcularon empleando las siguientes fórmulas:

20

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{glucosa} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \times \text{insulina} \left(\frac{\mu\text{UI}}{\text{ml}} \right)}{22,5}$$

$$\text{HOMA} - \beta = \frac{20 \times \text{insulina} \left(\frac{\mu\text{UI}}{\text{ml}} \right)}{\text{glucosa} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) - 3,5}$$

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\log \text{insulina} \left(\frac{\mu\text{UI}}{\text{L}} \right) + \log \text{glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)}$$

25

El cálculo de los parámetros para el grupo de ratas enfermas incluye sólo aquellos animales que se ajustan a los criterios diagnóstico de diabetes utilizados en este documento, es decir, hiperglucemia sostenida y valores de glucosa en sangre en PTGO > 200 mg/dl a los 90-120

min de ingesta y que se corresponden con el 37,5% de la población tratada con el agente inductor de la enfermedad según el ejemplo 3.3.

5 Tabla 1. Glucosa, Insulina e índices (HOMA-IR, HOMA-β y QUICKI) de las ratas que tomaron el extracto de cascarilla y las ratas enfermas del estudio de prevención. Se representan la media ± EEM. Análisis estadístico mediante la prueba t-Student. Letras diferentes muestran diferencias significativas con p<0,05.

Grupos	Glucosa (mmol/L)	Insulina (mIU/ml)	HOMA-IR	HOMA-β	QUICKI
Enfermas	17,867±2,796 ^a	6,91±0,98	8,60±0,92 ^a	9,67±1,15 ^a	0,295±0,007 ^a
ECCA	11,486±0,388 ^b	7,08±0,91	3,30±0,46 ^b	15,87±0,88 ^b	0,321±0,007 ^b

10 La comparación de los resultados de glucosa, insulina e índices de sensibilidad a la insulina de las ratas enfermas según los criterios diagnósticos anteriormente indicados y las tratadas con extracto de cascarilla tostada de café indican que el extracto ejerce un efecto glucorregulador efectivo. El tratamiento con el extracto causó una disminución significativa de los niveles de glucosa en sangre, de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y una mejora de la función pancreática (HOMA- β) y de la sensibilidad a la hormona (QUICKI).
15

Ejemplo 3.5. Capacidad para inhibir la actividad de la alfa-glucosidasa intestinal

La capacidad para inhibir la actividad de la alfa-glucosidasa intestinal se determinó *in vitro* empleando un método fluorimétrico. Como sustrato fluorogénico se empleó 4-
20 metilunberiferona- alfa-D-glucopiranososa 0,2 mM y el ensayo se realizó en formato de micro-método. La reacción enzimática se llevó a cabo en tampón fosfato 0,1 M pH 6,9 y empleando alfa-glucosidasa de intestino de rata. Como sustancia de referencia se utilizó
25 acarbosa en un rango de concentración de 0,0001 – 25 mM que es considerado el inhibidor más efectivo de la enzima intestinal. La dosis de extracto de cascarilla tostada de café suministrada a los animales causó un 100% de inhibición de la actividad de la enzima. La figura 5 muestra el valor de IC50 (mg/ml) para ACG y extracto de cascarilla tostada de café, respectivamente. Ambos productos resultaron efectivos inhibidores de la actividad enzimática. Por el contrario, las concentraciones de cafeína ensayadas no inhibieron la
30 actividad enzimática *in vitro*.

En consecuencia, puede concluirse que el extracto puede utilizarse como potencial agente preventivo de la diabetes e hipoglucemiante debido, al menos en parte, al efecto inhibidor de la alfa-glucosidasa intestinal observado.

5 **Ejemplo 3.6. Efecto sobre el peso corporal**

Los animales se pesaron periódicamente durante las 6 semanas que duró el ensayo según se describe en el apartado C). Los resultados del peso corporal medio de cada grupo al final del experimento se presentan en la figura 6. Se observó una reducción en el peso corporal como consecuencia del desarrollo de la patología. Los resultados están en línea con los descritos en estudios previos que establecen una asociación entre la reducción del peso corporal y la hiperglucemia (Lo *et al.* 2004. *Life Science* 74, 2897-908). Los animales tratados con extracto de cascarilla tostada de café 140 mg/kg presentaron valores de peso corporal similares a los encontrados en individuos sanos (control I) y significativamente superiores ($p>0,05$) a los encontrados en individuos enfermos sin tratamiento (control I).

Ejemplo 3.7. Efecto sobre el peso del hígado

Se determinó el peso relativo del hígado en proporción al peso corporal para controlar el aumento del peso del órgano como consecuencia de hipertrofia debida al desarrollo de la patología. Tras las 6 semanas de tratamiento tal y como se describe en el apartado C), los órganos se pesaron tras el sacrificio y se calculó el peso relativo de los mismos dividiendo el peso del órgano (g) por el peso total del animal al final del estudio (g). Los resultados indican que los tratamientos afectan al peso relativo del hígado (ver figura 7) y pueden deberse a la disminución de peso y a la acumulación de triglicéridos en hígado como consecuencia de la hiperglucemia que se ha inducido químicamente. Se encontraron valores para animales sanos y tratados con agente químico inductor de diabetes y extracto de cascarilla tostada de café en una dosis de 140 mg/kg similares ($p>0,05$) y estadísticamente inferiores ($p<0,05$) a los animales enfermos que no recibieron ningún tratamiento. Este resultado apoya que el tratamiento con el extracto mejora o preserva la salud de los animales evitando el desarrollo de la patología. Los resultados están de acuerdo con los que se muestran en la figura 4.

EFECTO LIPORREGULADOR**Ejemplo 3.8. Efecto sobre los niveles plasmáticos de colesterol**

5 Para la determinación de colesterol total en plasma se empleó un kit basado en el método colorimétrico enzimático de la colesterol esterasa (*Spinreact*, S.A./S.A.U, Sant Esteve de Bas, España; Ref. 1001090). El modelo de inducción química de diabetes ensayado no afectó los niveles plasmáticos de colesterol. Los tratamientos con ACG (1,5 y 10 mg/kg, respectivamente) y extracto de cascarilla tostada de café disminuyeron significativamente
 10 ($p < 0,05$) los niveles de colesterol plasmático al final del período experimental tal y como se indica en el apartado C) (ver figura 8). Los resultados sugieren que el extracto de cascarilla tostada de café presenta un potencial liporregulador y por tanto preventivo y terapéutico de enfermedades relacionadas con la dislipidemia.

15 Ejemplo 3.9. Efecto sobre los niveles plasmáticos de triglicéridos

Para la determinación de triglicéridos en plasma se empleó un kit basado en la hidrólisis de los triglicéridos y la posterior determinación del glicerol liberado (*Spinreact*, S.A./S.A.U, Sant Esteve de Bas, España; Ref. 1001319). La inducción química de la diabetes causó un
 20 incremento significativo de los niveles de triglicéridos plasmáticos en las ratas que no recibieron ningún tratamiento ($p < 0,05$). Los niveles plasmáticos medios de triglicéridos encontrados en ratas control I (sanas) y tratadas con componentes de café y extracto de cascarilla de café antes y después de la inducción química de la diabetes fueron del mismo orden de magnitud ($p > 0,05$) al final del período experimental tal y como se indica en el
 25 apartado C) (ver figura 9). Los resultados sugieren que el extracto de cascarilla tostada de café presenta un potencial preventivo y terapéutico de la hipertrigliceridemia y de las patologías relacionadas. En consecuencia, los resultados que se describen en el presente ejemplo apoyan el efecto liporregulador del extracto de cascarilla de café.

30 Ejemplo 3.10. Efecto inhibidor de lipasa

La capacidad inhibidora de lipasa del extracto de cascarilla tostada de café y sus componentes (ACG y CF), en las concentraciones ensayadas en el estudio *in vivo*, se determinó espectrofotométricamente empleando los reactivos para tales fines
 35 comercializados por la empresa *Trinity Biotech* (*Procedure No. 805, Trinity Biotech, Jamestown, NY*), según el protocolo por Gironés-Vilaplana *et al.* (2013. *International Journal*

of *Food Sciences and Nutrition*, 64, 897-906). El análisis reveló que el extracto de cascarilla tostada de café en la dosis suministrada a los animales (140 mg/kg de peso) inhibió en un 41,73% la actividad de la lipasa pancreática *in vitro*. El ACG en las concentraciones ensayadas (3,1 mg/ml) causó una inhibición del 30,70% de la actividad enzimática mientras que la cafeína (1,56 mg/ml) resultó inefectiva.

Los resultados apoyan que el efecto preventivo y terapéutico del extracto podría asociarse al menos en parte a su carácter glucorregulador y liporregulador debido a su capacidad para inhibir las enzimas glucosidasa intestinal y lipasa pancreática, respectivamente. Por otra parte, sugieren que la composición particular del extracto es determinante de estas actividades. No se puede atribuir los efectos observados a un único compuesto.

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de un producto bioactivo que se selecciona de entre
- 5 a) cascarilla tostada del café, o
- b) un extracto de cascarilla tostada de café (ECCA) que comprende un mínimo de 80 mg de ácido clorogénico (ACG) y 985 mg cafeína (CF) por cada 100 g de extracto,
- 10 en la elaboración de una composición útil para la prevención y tratamiento de al menos un factor de riesgo de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se selecciona de entre hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y obesidad, o de todos ellos de forma simultánea.
- 15 2.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que la composición es, adicionalmente, útil para la prevención y tratamiento de al menos una de las patologías que conforman el síndrome metabólico y que se selecciona de entre diabetes y patologías cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos, o de ambas de forma simultánea.
- 20 3.- Uso según la reivindicación 2, caracterizado por que la diabetes es diabetes mellitus tipo 2.
- 4.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, caracterizado por que las patologías cardiovasculares asociadas a cambios en el patrón de los lípidos séricos son vasculopatías.
- 25 5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la composición es, adicionalmente, útil para la prevención y tratamiento del síndrome metabólico.
- 30 6.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el producto bioactivo es un extracto de cascarilla tostada de café que se obtiene por extracción con 2 volúmenes de agua por cada parte de cascarilla, a una temperatura de 100 °C durante un mínimo de 10 minutos.

7.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la composición es un suplemento alimenticio útil para la prevención.

5 8.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la composición es una composición farmacéutica útil para la prevención y tratamiento.

9.- Uso de un producto bioactivo tal y como se describe en la reivindicación 1, como coadyuvante tecnológico para reducir el índice glucémico en un alimento.

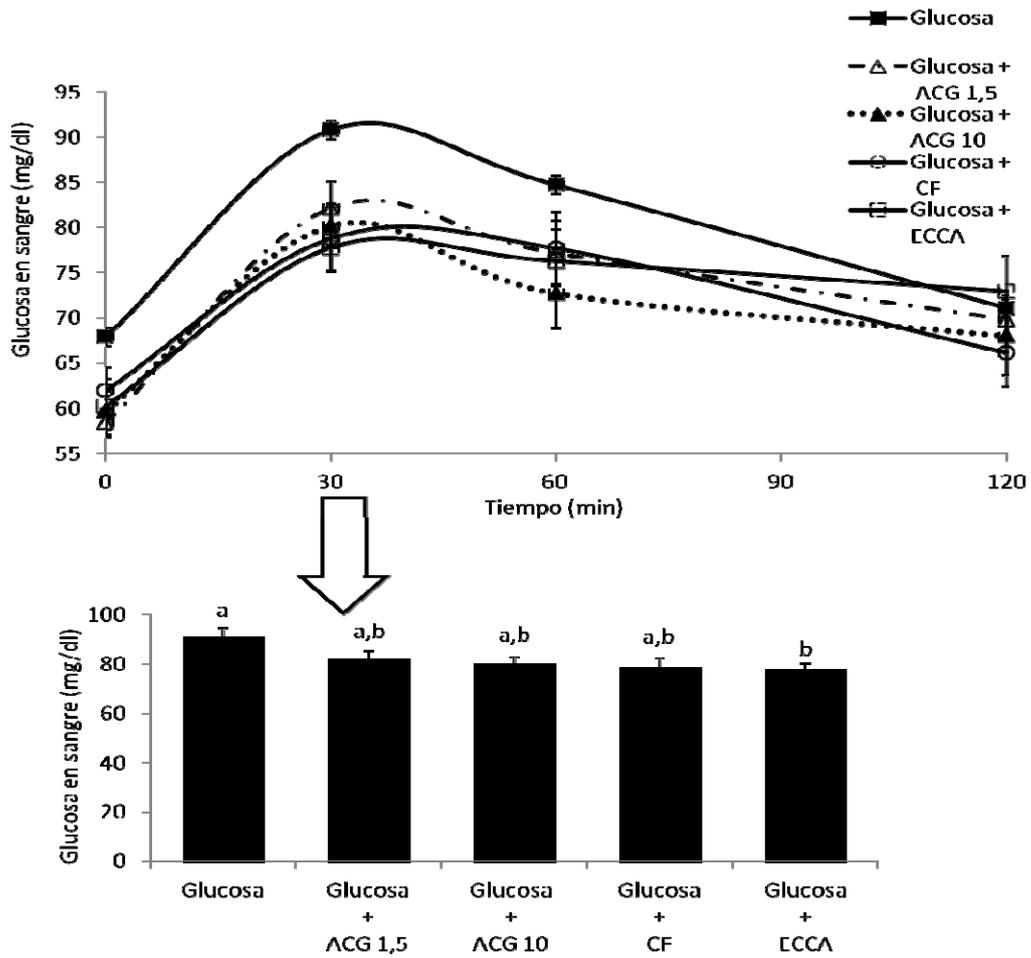


FIG. 1

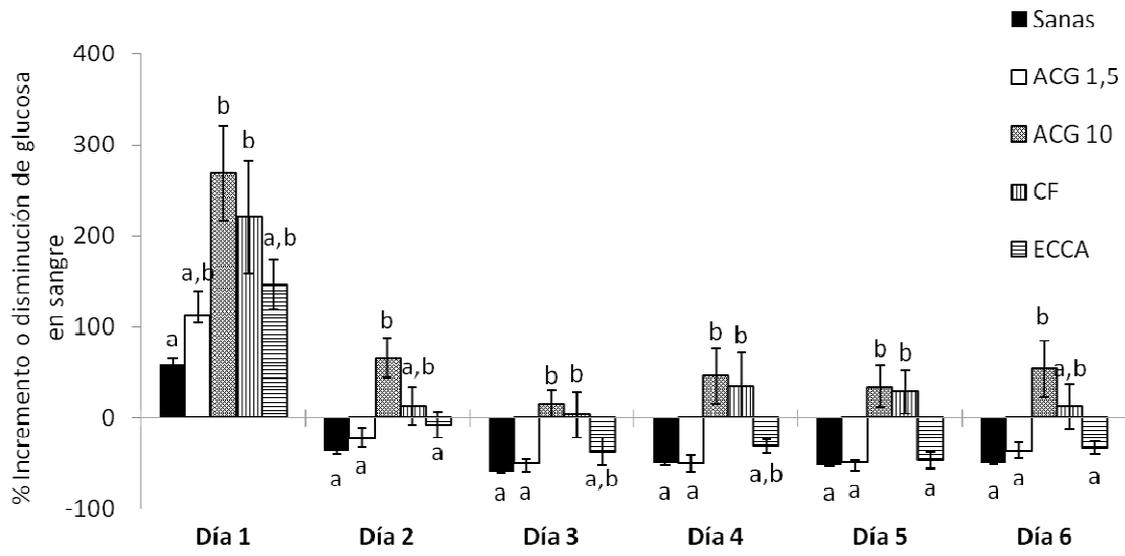


FIG. 2

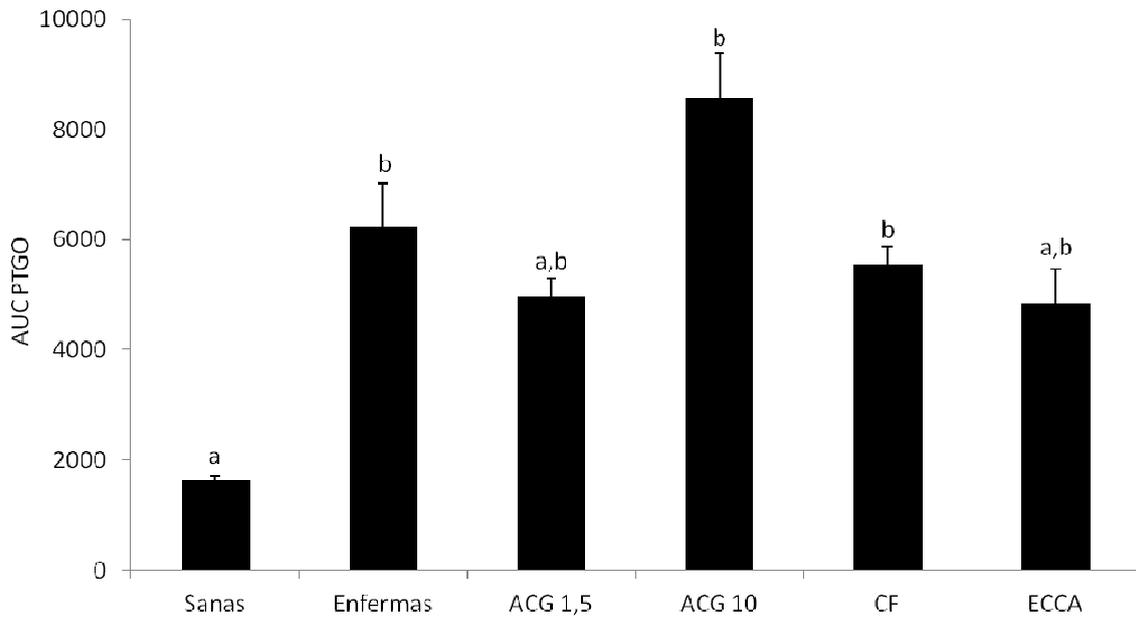


FIG. 3

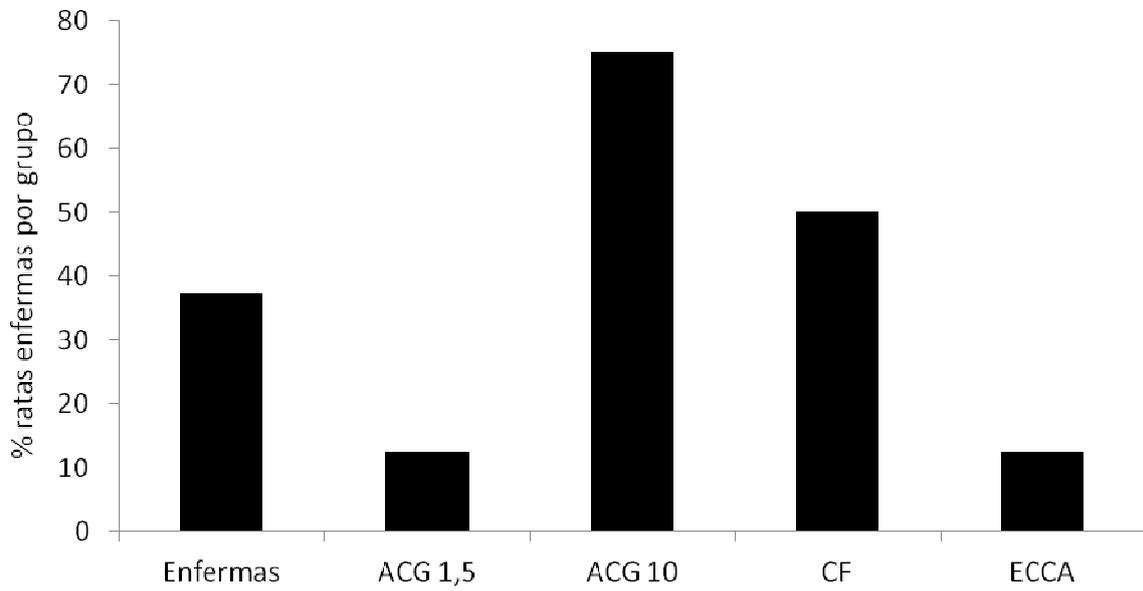


FIG. 4

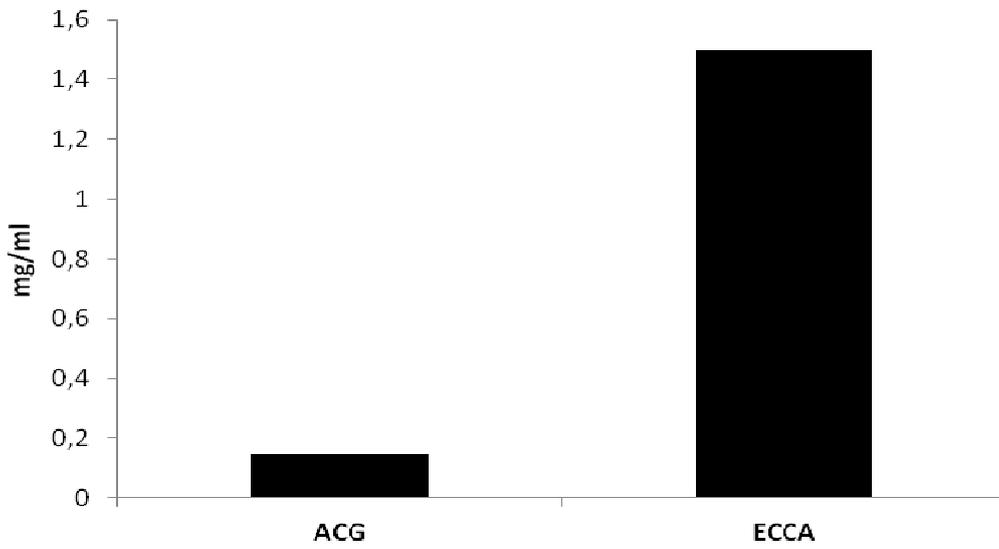


FIG. 5

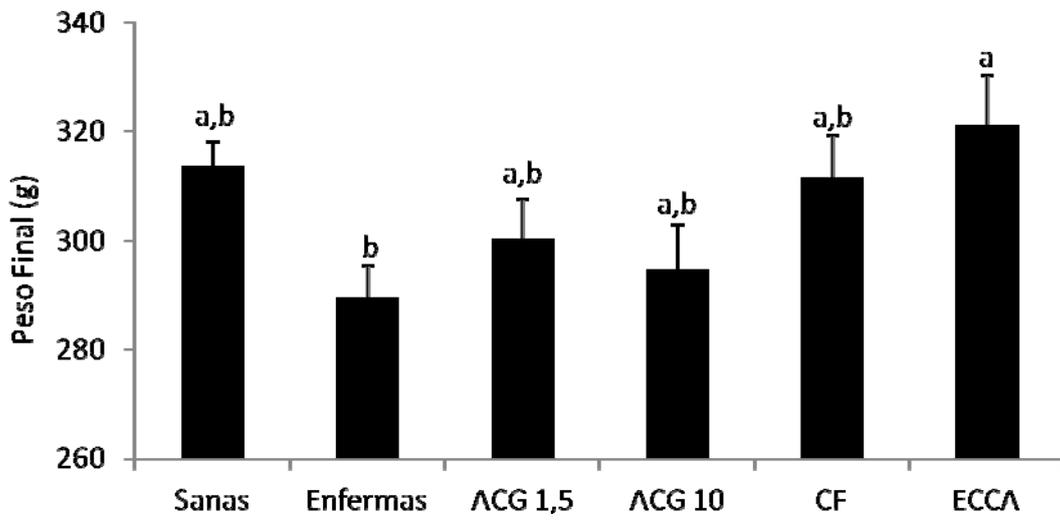


FIG. 6

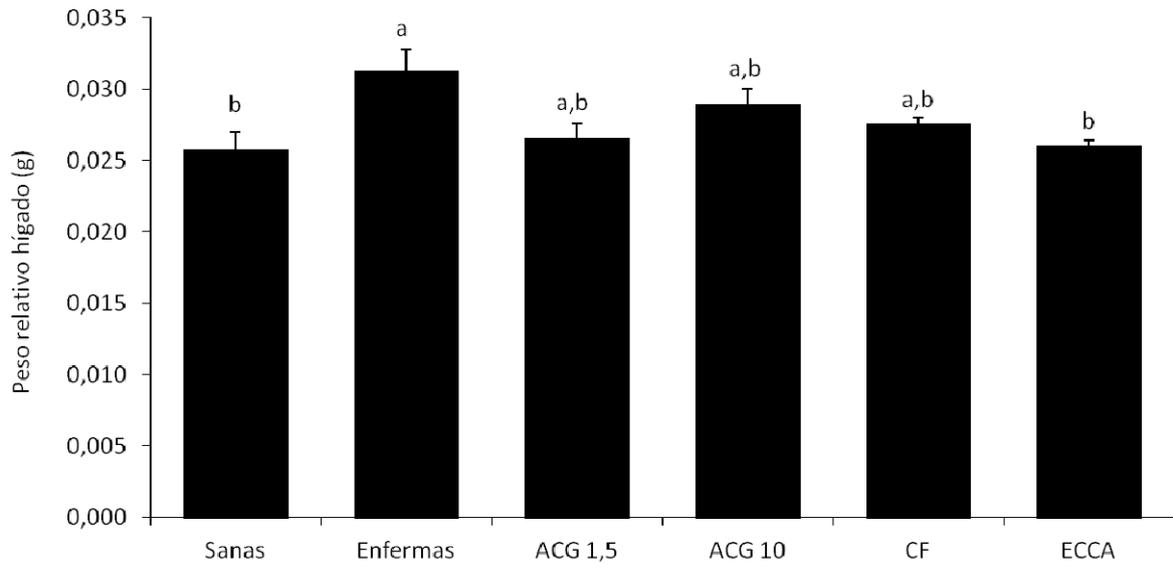


FIG. 7

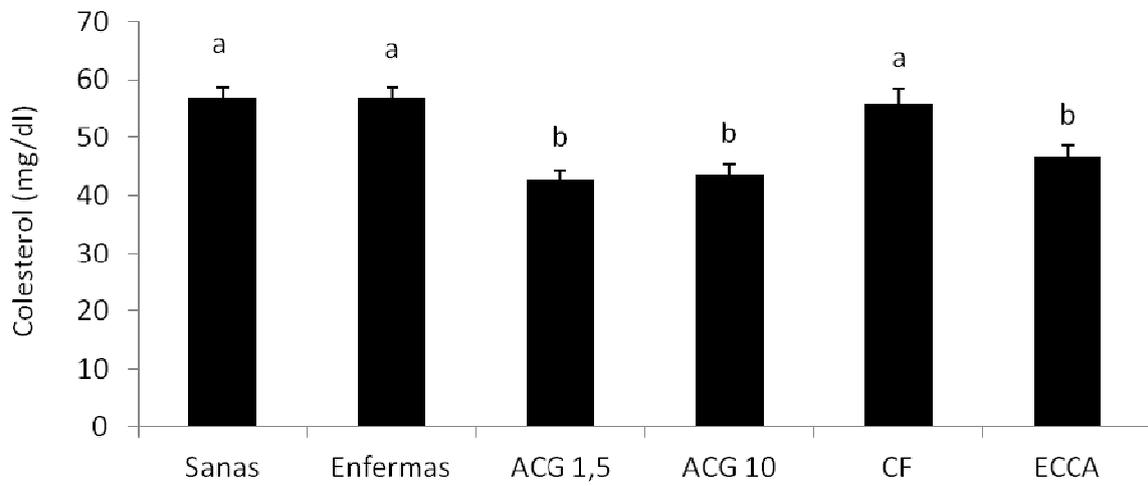


FIG. 8

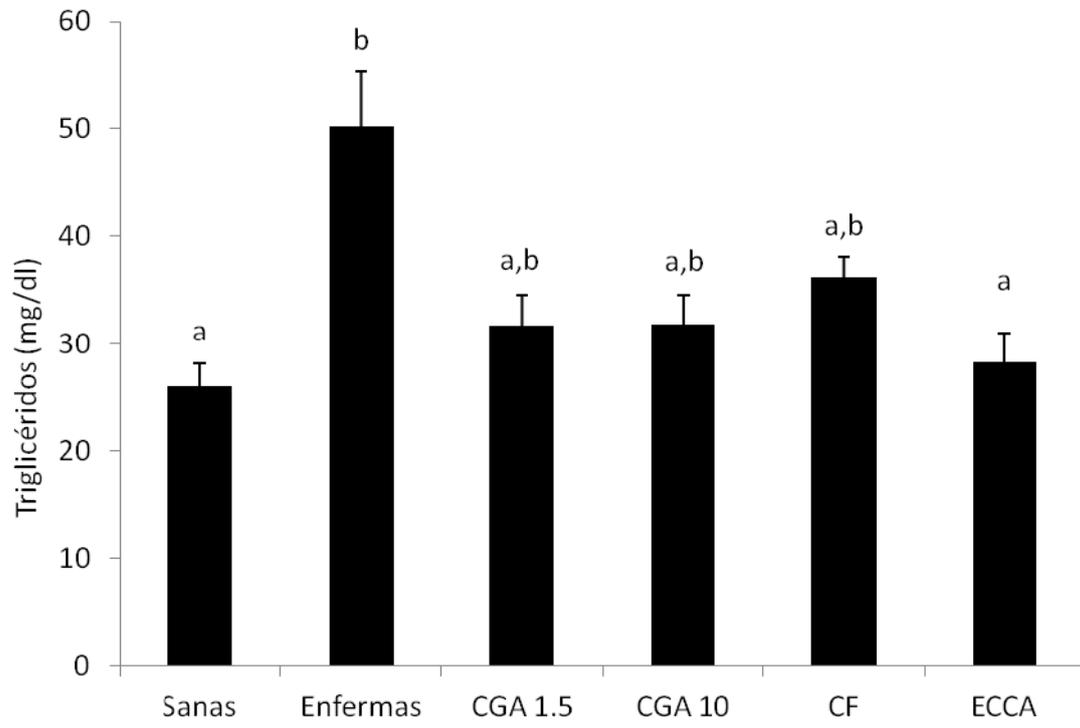


FIG. 9