

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 210**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)

**A23L 33/105** (2006.01)

**A23K 10/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2009 PCT/EP2009/063492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10118789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2009 E 09740877 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2418965**

54 Título: **Combinaciones de hidroxitirosol para mejorar la función mitocondrial y producción de energía**

30 Prioridad:

**17.04.2009 US 202888 P**  
**17.04.2009 WO PCT/EP2009/054585**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2016**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**FOWLER, ANN;**  
**FRIEDEL, ANGELIKA;**  
**KNUTTI, DARKO;**  
**KURATLI, KARIN;**  
**RAEDERSTORFF, DANIEL;**  
**WANG-SCHMIDT, YING y**  
**WERTZ, KARIN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 592 210 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

Combinaciones de hidroxitirosol para mejorar la función mitocondrial y producción de energía.

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a una composición que contiene hidroxitirosol ("HT") o un precursor de hidroxitirosol en asociación con cafeína. Estas composiciones mejoran de manera sinérgica la propia capacidad del organismo para la generación de energía y/o mejoran la generación de energía celular. También se refiere a composiciones alimenticias y nutracéuticas útiles para afecciones caracterizadas por funcionamiento alterado de las mitocondrias y biogénesis, tal como fuerza cardíaca, diversas enfermedades hepáticas, mejoran la relación músculo/grasa y la resistencia muscular.

**10 Antecedentes de la invención**

Las mitocondrias son organelos en la célula responsables de la producción de energía aeróbica. La membrana interna de las mitocondrias está embebida con una cadena respiratoria que contiene los complejos I, II, III, IV y V, que transportan electrones y producen ATP por una serie de reacciones rédox, un procedimiento denominado fosforilación oxidativa. El metabolismo aeróbico de la energía es más eficaz que la producción de energía anaeróbica. La producción de energía anaeróbica implica la conversión de glucosa en lactato (glicólisis) y genera sólo 8 Moles de ATP por Mol de glucosa. Durante el metabolismo aeróbico de la energía, la glucosa se oxida completamente (por glicólisis, ciclo de Krebs y la cadena electrónica mitocondrial) a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, al tiempo que da lugar a 38 Moles de ATP/mol de glucosa.

20 Hay una horquilla metabólica crítica en el camino al final de la glicólisis. En esta horquilla, la glucosa se ha convertido de una molécula de 6 carbonos en dos, moléculas de 3 carbonos denominadas ácido pirúvico o piruvato. Este piruvato puede ser transportado a las mitocondrias vía la enzima piruvato deshidrogenasa o convertido en ácido láctico vía la enzima lactato deshidrogenasa. La entrada en las mitocondrias expone el piruvato a más ruptura enzimática oxidación, y un alto rendimiento de ATP por glucosa. Este procedimiento en el interior de las mitocondrias requiere por último que actúen moléculas de oxígeno y es por lo tanto "aeróbico". La conversión en lactato significa un punto muerto temporal en el procedimiento de producción de energía y el potencial para la fatiga contráctil debido a disminución del pH celular si continúa descontrolada la acumulación de ácido láctico.

Además de su función conocida de suministrar energía a una célula, las mitocondrias y sus componentes participan en una serie de distintas actividades celulares. Por ejemplo, las mitocondrias también controlan la termogénesis y el procedimiento de muerte celular programada y están implicadas así en el proceso de envejecimiento.

30 Las mitocondrias contienen un alto nivel de oxidantes, puesto que la cadena respiratoria genera especies reactivas, por ejemplo, aniones superóxido, si funciona con eficacia reducida o durante desacoplamiento de energía. Se generan aniones superóxido como subproductos en varias etapas de la cadena de transporte de electrones, tal como la reducción de coenzima Q en complejo III, donde se forma un radical libre altamente reactivo como un compuesto intermedio (Q.-). Este compuesto intermedio inestable puede conducir a "fuga" de electrones, cuando los electrones saltan directamente a oxígeno y forman el anión superóxido, en vez de moverse por la serie normal de reacciones controladas de la cadena de transporte de electrones.

40 Un antioxidante es una molecular capaz de ralentizar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes terminan reacciones en cadena de oxidación por eliminación de compuestos intermedios de radicales libres e inhiben otras reacciones de oxidación siendo oxidados ellos mismos. Los agentes reductores tales como tioles o polifenoles ejercen con frecuencia propiedad antioxidante. Antioxidantes conocidos tales como Vitamina A, C y E eliminan radicales libres y protegen el ADN, proteínas y lípidos de daño. Los antioxidantes también protegen las mitocondrias de especies de oxígeno reactivas y radicales libres generados durante la producción de ATP.

Mientras ha sido aceptado en general en el pasado que la administración de antioxidantes sería beneficiosa para fomentar la biogénesis de las mitocondrias, no se ha demostrado que éste sea el caso. Gomez-Carbera et al. 2.008 Am. J Clin. Nutr. 87 (1): 142-149, demostraron en un estudio clínico aleatorizado de doble ciego, que la administración oral de 1 g de Vitamina C al día daba como resultado en realidad una biogénesis de las mitocondrias disminuida en el músculo esquelético.

50 Se ha descrito que el hidroxitirosol en el pasado presentaba efectos cardiovasculares positivos (véase, por ej., Gonzalez-Santiago et al 2.006 *Atherosclerosis* 188: 35-42 o Mitro et al 2.003 *NMCD. Nutritional Metabolism and Cardiovascular Diseases* 13 (5): 306) pero estos están relacionados con los efectos anti-ateroscleróticos de hidroxitirosol y/o su estado como antioxidante.

55 La patente china CN 101 095 447 A describe un café preservante de la salud que se prepara a partir de granos de café, judías mungo, lentejas blancas oreja de Judas, champiñones secos (recogidos en invierno), aceitunas, ajo, cebolla, madreselva, diente de león, higo, convalaria, bayas de goji, *Atractylodes Macrocephala*, *Rhizoma Polygonati*, *Herba Cistanches* y Raíz de Astrágalo.

La patente japonesa JP 2007 119373 A describe un agente de descomposición del producto de la reacción de Maillard, contiene extracto de hoja de olivo, pimienta japonesa, cúrcuma, azafrán, menta suave, jengibre, ginseng, hoja de loto, Citrus depressa, frijoles blancos de bush, Apocynum venetum, kumazasa, balsamina, alcachofa de Jerusalén, hojas de cebada, algas marrones, patata konjak, granos de café, grano de uva, manzana, planta parasitaria, Angelica keiskei, catequina, kumquat blando, Aurantii immaturi, cáscara de cítrico o naranja seca.

**Descripción detallada de la invención**

Se ha encontrado, de acuerdo con esta invención, que el hidroxitirosol ("HT") en asociación con cafeína potencia de manera sinérgica el metabolismo de la energía propia del organismo por inducción de biogénesis mitocondrial y puede conducir a una función mitocondrial aumentada en los tejidos.

10 Así, un aspecto de esta invención es una composición nutracéutica o alimenticia que comprende hidroxitirosol en asociación con cafeína caracterizada por que la dosis es 10 - 200 mg de hidroxitirosol y 50 - 450 mg de cafeína.

15 Se describe en este documento un método para mantener o aumentar la función mitocondrial y la actividad por biogénesis mitocondrial aumentada que comprende la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng y observar los efectos de la función mitocondrial.

20 La biogénesis mitocondrial se refiere a procedimientos de crecimiento, multiplicación y mantenimiento de la salud de las mitocondrias. La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que implica tanto agentes nucleares como mitocondriales. El ADN mitocondrial codifica un pequeño número de proteínas, que se traducen en los ribosomas mitocondriales. La mayoría de estas proteínas son subunidades altamente hidrófobas de la cadena respiratoria, que se localizan en la membrana mitocondrial interna. Las proteínas nucleares codificadas se traducen en los ribosomas citosólicos y se importan en las mitocondrias. Estas proteínas incluyen proteínas estructurales, enzimas o subunidades enzimáticas, componentes de la maquinaria de importación, replicación, transcripción y traducción y chaperonas.

25 Las células tienen que cambiar al metabolismo anaeróbico de energía menos eficaz, una vez que la capacidad para la respiración aeróbica (cadena de electrones) ya no es suficiente. De ahí que la biogénesis mitocondrial aumentada mejore la capacidad para el metabolismo aeróbico de energía y así aumente la capacidad para una producción eficaz de energía.

30 La "biogénesis mitocondrial" como se usa por toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluye todos los procedimientos implicados en el mantenimiento y el crecimiento de las mitocondrias, incluyendo los requeridos para división y segregación mitocondrial durante el ciclo celular.

35 El uso de la expresión "hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng" se destina a incluir cada combinación única de hidroxitirosol con cada uno de los compuestos individuales dentro del grupo.

40 "Observar los efectos de la función mitocondrial aumentada" y "observar los efectos de la biogénesis mitocondrial" significa que la entidad que ingiere/aplica la composición de asociación percibe al menos uno de los efectos enumerados a continuación o que un tercer observador puede percibir o medir este efecto.

Los efectos de la función mitocondrial aumentada y/o biogénesis mitocondrial incluyen observaciones de que la asociación de esta invención:

- 45 ayuda a aumentar la resistencia
- ayuda a aumentar la recuperación después del ejercicio
- ayuda a reducir la fatiga muscular
- ayuda a reducir el dolor muscular
- complementa el efecto a corto plazo inmediato de la cafeína con un efecto sostenido sobre la generación de energía
- 50 ayuda a aumentar la generación de energía a partir de grasa
- ayuda a reducir en lactato en plasma durante el ejercicio

## ES 2 592 210 T3

- ayuda a mantener la fuerza muscular en condiciones de estrés oxidativo
- ayuda a proteger contra el estrés oxidativo inducido por el ejercicio
- ayuda a que el organismo presente más energía de una manera natural y sostenida - sin cafeína y con sólo 1 caloría
- ayuda a que el organismo encuentre más energía sin tomar demasiada cafeína.
- 5   proporciona energía de larga duración para sustentar su apretada agenda
- ayuda a reforzar la producción de energía propia del organismo de una forma sostenida natural
- ayuda a mantener incluso más niveles de energía durante todo el día
- puede proporcionar en asociación con la cafeína energía inmediata y sostenida
- ayuda a que el organismo se adapte al ejercicio
- 10  ayuda a preparar el organismo para objetivos de ejercicio
- ayuda a revitalizar su figura
- facilita la reanudación de su programa de ejercicio
- ayuda a empezar de nuevo
- ayuda a sentirse más enérgico
- 15  ayuda a sentirse más activo
- soporta el celo por la acción
- ayuda a afrontar su ajetreado estilo de vida
- capacidad de trabajo muscular aumentada
- capacidad aeróbica mejorada
- 20  rendimiento físico mejorado
- rendimiento mejorado de ejercicio
- resistencia de carrera mejorada, distancia de carrera mejorada y/o tiempo de carrera mejorado o
- estimula la formación de energía a partir de nutrientes.
- 25  Como se usa por toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término “cantidad que induce biogénesis” significa que la biogénesis mitocondrial completa se mantiene al menos al nivel que estaba presente cuando se ingirió originalmente el hidroxitirosol. Esto se puede determinar in vitro vigilando la cantidad y el estado de funcionamiento mitocondrial en una muestra de tejidos o como se describe más en los Ejemplos. Adicionalmente, esto se puede determinar in vivo por medición del contenido en ATP de tejido o el consumo de oxígeno durante el ejercicio ( $VO_2$  máx) o *ex vivo* por análisis de la transcripción para la regulación hacia arriba de los marcadores mitocondriales (tales como Tfam) o detectando la presencia aumentada de ADN mitocondrial en biopsias de tejidos.
- 30  Esta propiedad de hidroxitirosol es distinta de la actividad conocida del hidroxitirosol como antioxidante.
- La “estimulación mitocondrial” como se usa por toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones significa que el compuesto aplicado a las mitocondrias conduce a la producción de ATP aumentada en la célula; una capacidad aumentada para producción de energía en la célula; una capacidad aumentada para generación o producción de
- 35  energía aeróbica en la célula y/o una capacidad aumentada para quemar grasa.
- El hidroxitirosol (3,4-dihidroxiifeniletanol) ("HT") puede ser de origen sintético o puede ser aislado o enriquecido a partir de hojas de olivo, frutos de olivo, pulpa de oliva, zumo de oliva o agua de vegetación de la producción de aceite de oliva. Así, el término “hidroxitirosol” también incluye cualquier material o extracto de una planta o cualquier material o extracto de partes de una planta o cualquier extracto/concentrado/zumo de frutas de una planta (tales como olivas) que lo contienen o un precursor, especialmente en una cantidad de al menos 1,5% en peso, preferiblemente en una cantidad de al menos 30% en peso y más preferiblemente en una cantidad de al menos 40%
- 40  en peso, más preferiblemente en una cantidad de al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% en peso y lo más preferiblemente en una cantidad de al menos 45% en peso, basado en el peso total del material o extracto vegetal. La forma comercial del extracto puede ser o no estandarizada a concentraciones inferiores de hidroxitirosol por
- 45  formulación del hidroxitirosol con excipientes de formulación adecuados. Los términos “material de una planta” y

“material vegetal” usados en el contexto de la presente invención significan cualquier parte de una planta, también los frutos.

Los precursores para hidroxitirosol incluyen polifenoles complejos, que se pueden metabolizar a hidroxitirosol en la ingestión, tal como oleuropeína. También incluye tirosol y precursores de tirosol y similares. Dichos polifenoles son conocidos y apreciados por los expertos en la materia.

En más realizaciones de la presente invención, los derivados de hidroxitirosol tales como ésteres y sales fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables se pueden usar en vez de o además de, hidroxitirosol. También es posible usar una mezcla de hidroxitirosol y derivados y precursores de hidroxitirosol. Los derivados pueden ser, por ejemplo, ésteres o glucósidos, y son conocidos para los expertos en la materia. Los ésteres preferidos de hidroxitirosol son, por ejemplo, acetatos o conjugados de glucurónido, así como oleuropeína que es el más preferido.

Así, una descripción de este documento es el uso de hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima, Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng.

En una realización preferida, el hidroxitirosol se usa en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima, Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1, B2, B3, B5, B6 y/o B12) y extracto de ginseng en la fabricación de un medicamento o producto alimenticio (para seres humanos y/o animales) que es útil para mantener o aumentar la biogénesis mitocondrial o la función mitocondrial.

En otra realización más, el hidroxitirosol se usa en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: cafeína, carnitina y una vitamina B.

Otra descripción de este documento es un método para mantener o aumentar la biogénesis mitocondrial en un individuo con necesidad del mismo que comprende administrar una cantidad inductora de biogénesis mitocondrial o estimuladora mitocondrial de hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng y observar los efectos de la biogénesis mitocondrial.

Otra descripción de este documento es el uso de hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng en la fabricación de un medicamento o producto farmacéutico (para seres humanos y/o para animales) que es útil en la protección de las mitocondrias frente a una serie de tensiones encontradas en el entorno diario.

Ejemplos de tensiones encontradas en el entorno diario incluyen luz UV (A), infecciones, exposición a contaminación medioambiental, inflamación y enfermedades degenerativas crónicas. Así, estos productos ayudan a asegurar la normal función mitocondrial frente a amenazas diarias, tales como cambios bioquímicos celulares como resultado de tensiones, enfermedades, malnutrición (incluyendo malnutrición que sea secundaria a otra enfermedad) o lesión.

Otra descripción de este documento son los productos nutracéuticos que comprenden una cantidad inductora de biogénesis mitocondrial de hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng y que fomenta el bienestar de las mitocondrias y estimula la función óptima de las mitocondrias.

Otra descripción de este documento es una composición cosmética que comprende una cantidad inductora de biogénesis mitocondrial de hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng y que fomenta el bienestar de las mitocondrias y que estimula la función óptima de las mitocondrias en la piel y que refuerza así el metabolismo de la energía de la piel.

## Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra la expresión de PGC-1 $\alpha$ . Valores cuantitativos tabulados para relación de PGC-1 $\alpha$ :

$\alpha$ -tubulina con una densitometría. Los valores son media  $\pm$  DE de cinco experimentos. \*  $p < 0,05$  frente a control; \*\* $P < 0,01$  frente a control.

5 La FIGURA 2 muestra la expresión de las proteínas mitocondriales. Se trataron adipocitos 3T3-L1 durante 48 h con hidroxitirosol. Se solubilizaron con posterioridad células en tampón de muestra SDS y se analizaron por ensayo de Western con anticuerpos frente a  $\alpha$ -tubulina, complejos de transporte de electrones mitocondriales. Los análisis cuantitativos de las bandas por densitometría se muestran en A, B, C y D para complejo I, complejo II, complejo III y complejo IV, mitocondrial, respectivamente. Los resultados mostrados son veces de aumento de control de 4 experimentos independientes comparado con células de control. \* $p < 0,05$  frente a control. \*\* $p < 0,01$  frente a control.

10 La FIGURA 3 muestra la expresión de ADN mitocondrial. Se trataron adipocitos 3T3-L1 durante 48 h con hidroxitirosol. Se cuantificaron productos PCR por fluorescencia usando verde SYBR. Los valores cuantitativos tabulados para relación de bucle D: ARN18s. Los resultados se expresan como % de control. Los datos son media  $\pm$  DE (n=5). \* $P < 0,05$  frente a control; \*\*  $p < 0,01$  frente a control.

15 La FIGURA 4 muestra el consumo de oxígeno en adipocitos 3T3-L1. Se separaron volúmenes iguales de células en alícuotas en pozos de una placa BD Oxygen Biosensor de 96 pozos. Se cubrieron las placas y se registró la fluorescencia en cada pozo con el tiempo con un espectrofotómetro de microplacas de fluorescencia. Los cambios cuantitativos en la velocidad respiratoria de los adipocitos durante cada condición se calcularon determinando las mediciones cinéticas. Los valores son media  $\pm$  DE; los resultados mostrados son % de control de 3 experimentos independientes comparado con células de control. \* $p < 0,05$  frente a control.

20 La FIGURA 5 muestra el efecto de tratamiento con hidroxitirosol sobre las actividades de los complejos en los adipocitos. (A) Complejo I, (B) Complejo II y (C) Complejo III y (D) Complejo IV. Se trataron los adipocitos con diferentes concentraciones de hidroxitirosol durante 48 h. Los valores son media  $\pm$  DE de datos de tres experimentos separados para complejo I y seis experimentos separados para complejo II y III y cada experimento se realizó por duplicado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  frente a control.

25 FIGURA 6 Efecto de tratamientos de HT sobre la expresión de ARNm de Cpt1a. Se trataron adipocitos 3T3-L1 durante 48 h con HT a 0,1; 1,0; 10 y 50  $\mu$ moles/l y se aisló ARN total. El número de ciclos al que se detectaron varias transcripciones se comparó con el de ARNs18S como un control interno. Los resultados se expresan como % de control. Los valores son media  $\pm$  DE de los resultados de al menos cuatro experimentos independientes. \* $P < 0,05$  frente a control sin tratamiento de HT.

30 FIGURA 7 El hidroxitirosol, proporcionado como un extracto de oliva que contiene 50% de hidroxitirosol a dosis de 50, 150 ó 300 mg/kg de peso corporal por día por sonda nasogástrica, aumenta la resistencia por hasta 50% en ratones después de 14 días de suplemento.

35 La FIGURA 8 muestra los efectos sinérgicos de hidroxitirosol en asociación con cafeína o L-carnitina en el potencial de membrana mitocondrial en células C2C12. A AICAR y 10  $\mu$ M de hidroxitirosol aumenta el potencial de membrana mitocondrial. B Las combinaciones de 1  $\mu$ M de hidroxitirosol con cafeína o con L-carnitina aumenta el potencial de membrana sinérgicamente. Se valoró el potencial de membrana mitocondrial relativo por los cambios en la fluorescencia de roja a verde emitida por el colorante JC-1. Se trataron las células durante 24 h con disolvente (-), 500  $\mu$ M de AICAR (AICAR), 1  $\mu$ M de hidroxitirosol o 100  $\mu$ M de hidroxitirosol (HT), 200  $\mu$ M de cafeína (Cafeína) y/o 200  $\mu$ M de L-carnitina (L-Carnitina) como se indica. Los datos mostrados son el promedio de cuadruplicados  $\pm$  desviación estándar.

40 PGC1 $\alpha$ , gamma-coactivador 1 alfa de receptor de activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés), un coactivador de transcripción, actúa como un regulador principal de una amplia serie de procedimientos metabólicos y fisiológicos y es un factor esencial en el procedimiento de biogénesis mitocondrial. La sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  estimula la biogénesis mitocondrial en células 3T3 haciéndolas más resistentes a factores estresantes oxidativos.

45 Los autores han demostrado que hidroxitirosol a 1,0-10  $\mu$ M, aumenta el nivel de proteína PGC1  $\alpha$  y fomenta la biogénesis mitocondrial. Creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, Vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng aumentarán sinérgicamente la actividad mitocondrial y evitarán la disfunción mitocondrial en diferentes tejidos. Además, hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, Vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng, puede mantener así la función del tejido/órgano y evitar el fallo del tejido/órgano provocado por la disfunción mitocondrial.

55 Un aspecto más de esta invención son composiciones que comprenden una cantidad inductora de biogénesis

mitocondrial de hidroxitirosol y al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreto de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng para activar sinérgicamente el metabolismo de la energía propia del organismo por sinergización con uno o más de los ingredientes (en el caso de resveratrol, CoQ10, creatina, vitaminas B y extracto de ginseng) o fomentando sinérgicamente la quema de grasa (en el caso de carnitina).

Si se usa extracto de ginseng en asociación con hidroxitirosol, está preferiblemente en la forma de extracto de raíz de ginseng.

Las asociaciones preferidas de la descripción de este documento incluyen:

- HT y resveratrol, quercetina, ácido alfa-lipoico o EGCG para aumento adicional en la biogénesis mitocondrial y la función mitocondrial, conduciendo a un aumento sinérgico de la capacidad mitocondrial para la generación de energía aeróbica.
- HT y CoQ10 y/o vitamina B2: HT aumenta la masa mitocondrial y estas mitocondrias recién sintetizadas requieren estar dotadas de CoQ10 y B2. Esto da como resultado una producción sinérgica de más ATP (energía).
- Para preparar más ATP y hacerlo disponible para el organismo (energía física, resistencia, fuerza muscular) se prefieren HT y creatina o HT, CoQ10 y/o B2 y creatina. HT aumenta la masa mitocondrial y estas mitocondrias recién sintetizadas requieren estar dotadas de CoQ10 y B2. La creatina transporta la energía generada en forma de ATP a las miofibras en una forma utilizable (fosfato de creatina).
- Para mejorar la composición corporal (relación grasa: músculo): HT y carnitina. La carnitina ayuda en el transporte de ácidos grasos a las mitocondrias para la quema de grasa y la producción de ATP. Se encontró sorprendentemente que HT regula hacia arriba CPT-1 (carnitina palmitoil transferasa 1), el transportador, que emplea carnitina para el transporte de ácidos grasos. CPT-1 es el garante de la oxidación de ácidos grasos mitocondriales debido a que regula el transporte de ácidos grasos de cadena larga por la membrana mitocondrial convirtiendo acil-CoA en acilcarnitina. Además, hemos encontrado sorprendentemente una elevación sinérgica del potencial de membrana mitocondrial por una asociación de hidroxitirosol y carnitina.
- Para energía inmediata y prolongada, se prefieren HT y cafeína. Las dosis son 10 - 200 mg de HT y 50 - 450 mg de cafeína. Además, encontramos sorprendentemente una elevación sinérgica del potencial de membrana mitocondrial por una asociación de hidroxitirosol y cafeína.

Otra descripción de este documento es HT en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreto de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng como ingrediente activo en "mejor para productos de energía" tales como bebidas energéticas, refrigerios incluyendo chocolate, galletas o barras.

Otro aspecto de esta invención es HT en asociación con cafeína en dosis de cafeína reducidas para gente que quisiera tener suficiente energía para su estilo de vida, pero quiere reducir su ingesta de cafeína.

La función mitocondrial, energía disponible así, disminuye con la edad. Así otra descripción de este documento es también productos energéticos que comprenden HT en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreto de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng, formulado para que la gente de más de 50, parezca mantener un nivel de energía joven, a fin de mantener un estilo de vida activo.

Rendimiento físico y adaptación a ejercicio

Un aumento en las mitocondrias puede beneficiar tanto a personas como a animales implicados en el ejercicio. La biogénesis de las mitocondrias se traduce en aumento de uso de oxígeno y energía aumentada al tiempo que compromete cualquier forma de ejercicio. Los volúmenes de mitocondrias mayores mejoran la capacidad para el metabolismo oxidativo de altas tasas de flujo glicolítico. Además, esto da como resultado una resistencia aumentada. Las fibras musculares, que tienen acceso a mayores almacenes de energía son capaces de contraerse más rápido y más completamente; así se pueden observar mejoras en velocidad y resistencia después de utilizaciones durante un periodo de tiempo.

Adicionalmente, la capacidad de oxidación de ácidos grasos mejorada da como resultado una utilización de glucosa disminuida a intensidades de ejercicio submáximas. Por otra parte, el metabolismo de las grasas transcurre vía una ruta diferente que la glucosa y no se produce ácido láctico. También, los tiempos de recuperación de lesiones, calambres y dolor que resultan de la producción de energía anaeróbica serán más rápidos.

5 En otra aplicación muscular, los músculos que utilizan energía más eficazmente son menos propensos a acumulación de grasa y por lo tanto hidroxitirosol y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng pueden ser utilizados para mejorar el modelamiento del cuerpo.

10 Las aplicaciones veterinarias de la biogénesis mitocondrial que induce la cantidad de hidroxitirosol y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng incluyen: aumentar el rendimiento físico en animales para carrera, tales como caballos y perros de carreras y camellos de carreras; aumentar la resistencia en animales de tiro.

15 El ejercicio físico regular también induce las mitocondrias como una adaptación al repentino incremento de demanda de energía durante el ejercicio. Las asociaciones sinérgicas reivindicadas pueden ayudar a preparar/adaptar el organismo para el ejercicio más allá de los niveles de ejercicio habituales. Esto es de interés predominantemente en personas que empiezan a hacer ejercicio (de nuevo) después de un descanso más prolongado (por ejemplo, varios días, semanas, meses, años) de ejercicio regular, que por lo tanto se sienten perezosos, débiles, lentos, cansados y fatigados cuando intentan volver a empezar a su régimen de ejercicios. También es de interés para atletas del estilo de vida (personas recreacionalmente activas, deportistas de fin de semana), que no tienen el tiempo para suficiente ejercicio para preparar durante sus giras o carreras/competiciones de fines de semana.

#### Sensación energética

Además de mejorar el rendimiento físico en personas que hacen ejercicio, la asociación de esta invención puede ayudar a generar la energía necesaria para el estilo de vida actual. La investigación del consumidor mostró que 37% de los encuestados (población general, Edad 16+, EE.UU. y 4 países europeos) con frecuencia se sienten cansados o sin energía. Un segundo estudio encontró que el 60% de los encuestados estaría interesado en productos que les ayudaran a tener más energía. Hoy en día, la gente con necesidad de un refuerzo de energía, consume café o bebidas energéticas que contienen cafeína, así como alto contenido en azúcar, refrigerios de alto contenido en grasa.

35 Si se consume en una dosis adecuada, el efecto inmediato de la cafeína para aliviar la fatiga es muy apreciado. Sin embargo, si se consume en exceso, puede ocasionar insomnio e hipertensión. Una taza de café típica puede contener aproximadamente 100 mg de cafeína. Si una persona toma regularmente 3-5 tazas al día, el consumo de cafeína puede ser bastante alto (+300 mg al día). El hidroxitirosol, debido a su defecto estimulador en la biogénesis mitocondrial, puede añadir un efecto a largo plazo de energía sostenida al efecto inmediato a corto plazo de la cafeína.

40 Por otra parte, el hidroxitirosol puede ayudar con el tiempo a reducir la dosis de cafeína necesaria para afrontar los deberes del día. Con la adición de hidroxitirosol a la dieta, se puede conseguir la misma sensación no letárgica, pero se reduce la cantidad de cafeína necesaria (a 100 mg o menos al día).

45 De manera similar, los consumidores con frecuencia toman alimentos con alto contenido en azúcares y/o grasa para proporcionar un refuerzo de energía. Sin embargo, con el aumento de energía prolongado de hidroxitirosol y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng, se reduce la cantidad requerida. Así, las combinaciones de HT de esta invención se pueden usar de manera favorable en ofertas de energía "mejor para ti" (BFY, por sus siglas en inglés) (bebidas, barritas, refrigerios, chicles, toma s, suplementos y similares) con un contenido menor en calorías de azúcar o grasa o en cafeína.

Así, la presente invención se refiere al uso de las asociaciones que contienen hidroxitirosol para:

- aumentar la capacidad propia corporal para generación de energía
- 55 • aumentar la capacidad aeróbica para el ejercicio
- desplazar la utilización de nutrientes para generación de energía de carbohidrato a quema de grasa

- complementar el efecto inmediato a corto plazo de la cafeína con un efecto prolongado sobre la generación de energía
- permitir que se reduzca la dosis de cafeína y/o azúcar y/o grasa necesaria para "continuar".

5 Así, otra descripción de este documento es una composición que comprende hidroxitirosol y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng para mantener o aumentar la biogénesis mitocondrial, en la que la biogénesis mitocondrial mantenida o aumentada da como resultado un refuerzo de energía prolongado. Una descripción más de este documento es un método para preparar una composición alimenticia que proporcione energía o mejore la atención que comprende hidroxitirosol y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng, en el que la composición alimenticia contiene un contenido reducido en cafeína, grasa y/o azúcar comparado con un artículo alimenticio similar que no contiene hidroxitirosol.

Relación músculo/grasa mejorada, moldeamiento corporal.

20 La presente invención se refiere al uso de hidroxitirosol y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng para:

- aumentar el metabolismo muscular para reforzar la movilización de energía;
- mejorar la masa muscular esquelética por estimulación de rutas anabólicas, inhibiendo rutas catabólicas y acelerando la regeneración muscular cuando se daña;
- desplazar la utilización de nutrientes para generación de energía de quemar carbohidrato o proteína a quemar grasa;
- fomentar la quema de grasa; actuar como un regulador de la quema de grasa, aumentando el gasto de energía por oxidación de ácidos grasos, aumentando el metabolismo de las grasas, fomentando la oxidación de las grasas, disminuyendo la grasa corporal y aumentando la masa muscular;
- ayudar a conseguir una buena silueta (moldeamiento corporal), disminuyendo la grasa corporal y aumentando la masa muscular magra y
- aumentar la termogénesis; aumentando el metabolismo de un ser humano o animal para quemar más energía;

### 35 Formulaciones

40 El hidroxitirosol o extractos de zumo de oliva que contienen hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng se pueden usar en cualquier forma adecuada tal como un alimento o una bebida, como Alimento para Usos Nutricionales Especiales, como suplemento dietético, como nutracéutico o en pienso o alimentación para animales.

45 El hidroxitirosol o extractos de zumo de oliva que contienen hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionado del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng se pueden añadir en cualquier fase durante el proceso normal de estos productos. Productos alimenticios adecuados incluyen por ej., barras de cereales, productos de panadería tales como tortas y galletitas u otros tipos de refrigerios tales como chocolate, nueces, osos de gominola, gomas de mascar y similares y también alimentos líquidos tales como sopas o sopas en polvo. Las bebidas adecuadas incluyen bebidas no alcohólicas y alcohólicas así como preparaciones líquidas que se tienen que añadir a agua potable y alimento líquido. Las bebidas no alcohólicas son preferiblemente agua mineral, bebidas para deportistas, bebidas energéticas incluyendo las que contienen glucuronolactona para agudeza mental aumentada y taurina para desintoxicación, bebidas energéticas híbridas, bebidas con base de agua mineral, zumos

de frutas, limonadas, batidos, tés y bebidas concentradas tales como toma s y mini-toma s. Las bebidas para deportistas pueden ser hipotónicas, hipertónicas o isotónicas. Las bebidas para deportistas pueden estar disponibles en forma líquida, como concentrados o como polvo (para disolver en un líquido, como por ejemplo agua). Ejemplos de Alimentos para Usos Nutricionales Especiales incluyen las categorías de alimentación deportiva, alimentos para adelgazamiento, fórmula infantil y alimentos clínicos. Piense incluye cualquier alimento para animales o mezcla previa de pienso, incluyendo artículos tales como premios para mascotas y refrigerios.

El término "suplemento dietético" como se usa en la presente memoria indica un producto tomado por la boca que contiene un compuesto o mezcla de compuestos destinados a enriquecer la dieta. El compuesto o mezcla de compuestos en estos productos puede incluir: vitaminas, minerales, yerbas u otros productos botánicos y aminoácidos. Los suplementos dietéticos pueden ser también extractos o concentrados y se pueden encontrar en muchas formas tales como comprimidos, cápsulas, geles suaves, *gelscaps*, líquidos o polvos. El suplemento dietético puede usarse también para fomentar la energía en las mitocondrias dérmicas, mejorando así las cualidades estéticas de la piel.

El término "nutracéutico" como se usa en la presente memoria indica la utilidad tanto en el campo de aplicación nutricional como farmacéutico. Las composiciones nutracéuticas según la presente invención pueden estar en cualquier forma que sea adecuada para administración al organismo animal incluyendo el organismo humano, especialmente en cualquier forma que sea convencional para administración oral, por ejemplo, en forma sólida tal como (aditivos/suplementos para) alimento o pienso, alimento o mezcla previa de pienso, comprimidos, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas y formulaciones efervescentes tales como polvos y comprimidos o en forma líquida tal como disoluciones, emulsiones o suspensiones como, por ejemplo, bebidas, pastas y suspensiones oleosas. Las formulaciones de liberación controlada (retrasada) que incorporan el hidroxitirosol o extractos de zumo de oliva que contienen hidroxitirosol según la invención también forman parte de la invención. Además, se puede añadir una multivitamina y un suplemento mineral a las composiciones nutracéuticas de la presente invención para obtener una cantidad adecuada de un nutriente esencial, que se pierde en algunas dietas. El suplemento multi-vitamínico y mineral puede también ser útil para la prevención de enfermedades y protección frente a pérdidas nutricionales y deficiencias debido a patrones de estilo de vida. El nutracéutico puede comprender además aditivos normales, por ejemplo, edulcorantes, saborizantes, azúcar, grasa, emulsores, conservantes. La nutrición también puede comprender otros componentes activos, tales como proteínas (hidrolizadas) como se describe, por ejemplo, en la patente internacional WO 02/45524. También pueden estar presentes antioxidantes en la nutrición, por ejemplo flavonoides, carotenoides, ubiquinonas, rutina, ácido lipoico, catalasa, glutatión (GSH) y vitaminas, tales como por ejemplo C y E o sus precursores.

En una realización más, una composición que contiene hidroxitirosol en asociación con al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: creatina, coenzima Q10, resveratrol, cafeína, carnitina, vitaminas B (B1 o tiamina; B2 o riboflavina; B3 o niacina o niacinamida; B5 o ácido pantoténico; B6 o piridoxina, piridoxal, piridoxamina o hidrocloreuro de piridoxina; B7 o biotina; B9 o ácido fólico o B12 o varias cobalaminas, tales como cianocobalamina), quercetina, ácido alfa-lipoico, EGCG y extracto de ginseng se aplica por vía tópica para mejorar la biogénesis mitocondrial de células dérmicas. Las preparaciones cosméticas o dermatológicas según la invención pueden estar en la forma de una suspensión o dispersión en disolventes o sustancias grasas o alternativamente en la forma de una emulsión o microemulsión (en particular de tipo O/W o W/O, tipo O/W/O o W/O/W, en las que O representa fase oleosa y en las que W representa fase acuosa), tales como una crema, una pasta, una loción, una loción espesada o una leche, una dispersión vesicular en la forma de pomada, un gel, una barra de tubo sólida o una mouse en aerosol y se puede proporcionar en forma de mouse, espuma o una espuma pulverizada, pulverizaciones, varillas o aerosoles o toallitas. Los ejemplos de preparaciones cosméticas o dermatológicas son preparaciones para el cuidado de la piel, en particular, aceites corporales, lociones corporales, geles corporales, cremas de tratamiento, pomadas de protección de la piel, geles humectantes, pulverizaciones humectantes, pulverizaciones corporales revitalizantes, preparaciones para después del sol o formulaciones protectoras solares.

Las preparaciones cosméticas o dermatológicas de la descripción de este documento pueden comprender además los adyuvantes y/o aditivos dermatológicos respectivamente cosméticos, normales, tales como conservantes/antioxidantes, sustancias grasas /aceites, agua, disolventes orgánicos, siliconas, espesantes, suavizantes, emulsionantes, agentes tamizadores de luz adicionales, agentes antiespumantes, humectantes, fragancias, tensioactivos, cargas, agentes secuestrantes, polímeros aniónicos, catiónicos, no iónicos o anfóteros o mezclas de los mismos, propelentes, agentes acidificantes o alcalinizantes, tintes, colorantes, pigmentos o nanopigmentos, estabilizantes de la luz, repelentes de insectos, agentes bronceadores de la piel, agentes blanqueantes de la piel, agentes antibacterianos, ingredientes activos conservantes o cualquier otro ingrediente formulado normalmente en los productos cosméticos.

En general entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de hidroxitirosol en la forma pura o en un extracto de oliva es eficaz por porción. Preferiblemente, se usa entre 1 mg y 250 mg de hidroxitirosol está presente en la forma pura o en el extracto de oliva e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 1 mg y 100 mg en un extracto de oliva.

La dosis diaria de hidroxitirosol para seres humanos (persona de 70 kg) puede ser al menos 0,1 mg. Puede variar de

1 a 500 mg, preferiblemente de 5 a 100 mg.

La dosis preferida de hidroxitirosol varía de 0,28 a 1,9 mg/kg de peso corporal metabólico para mamíferos, según lo cual

"peso corporal metabólico" [en kg] = (peso corporal [en kg])<sup>0,75</sup>

5 para mamíferos. Eso significa por ejemplo que para un ser humano de 70 kg la dosis diaria preferida variaría entre 6,77 y 45,98 mg, para un perro de 20 kg la dosis diaria preferida variaría entre 2,23 y 15,1 mg.

Las dosis de resveratrol oscilan típicamente de 1 mg - 450 mg/d por ser humano. El resveratrol se puede fabricar de manera sintética usando procedimientos conocidos o extraer de plantas incluyendo Centáurea negra gigante.

10 Se puede adquirir CoQ10 de Kaneka, EE.UU. Las dosis preferidas son 3 - 100 mg al día por persona y es más preferido 30-50 mg.

Las dosis de creatina oscilan preferiblemente de 1 g - 25 g al día por persona. Está comercialmente disponible.

Las dosis de carnitina oscilan típicamente de 250 mg - 1 g al día por persona. Está comercialmente disponible como "CARNIPURE" de Lonza.

Las dosis de cafeína son típicamente de 6 mg - 450 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

15 Las dosis de ginseng son preferiblemente 100 mg - 5 g de polvo de raíz seca o extracto con el correspondiente contenido en ginsenosidos al día por persona.

Se conocen RDA/DRI (consumo diario recomendado/ ingesta diaria recomendada (por sus siglas en inglés) de varias vitaminas B, como en esta tabla de

[http://www.anyvitamins.com/rda.htm#Water%20Soluble%20Vitamins\\*](http://www.anyvitamins.com/rda.htm#Water%20Soluble%20Vitamins*)

20 Las dosis de vitaminas preferidas de acuerdo con esta invención son de 10% a 1.000% de la DRI (ingesta recomendada diaria)/RDA (consumo diario recomendado) como se recomienda en la actualidad en EE.UU. o Europa. Se puede encontrar la DRI en

[http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI//DRI\\_Thiamin/566-567\\_150.pdf](http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI//DRI_Thiamin/566-567_150.pdf).

Las dosis de vitaminas preferidas son como sigue:

25 Las dosis de tiamina son típicamente de 0,1 - 10 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

Las dosis de riboflavina son típicamente de 0,1 - 10 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

Las dosis de niacina son típicamente de 1 - 200 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

Las dosis de ácido pantoténico son típicamente de 1 - 100 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

30 Las dosis de vitamina B6 (tales como Piridoxin, piridoxal o piridoxamina) son típicamente de 0,1 - 20 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

Las dosis de biotina son típicamente de 0,1 - 20 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

Las dosis de cobalamina son típicamente de 0,1 - 20 microg al día por persona. Está comercialmente disponible.

35 Las dosis de quercetina son típicamente de 50 mg a 2.000 mg al día por persona como extracto de planta por ejemplo de manzanas (por ejemplo, cáscara), cebollas (por ejemplo, cáscara) u hojas de té. Está comercialmente disponible.

Las dosis de ácido alfa-lipoico son típicamente de 200 mg - 1.800 mg al día por persona. Está comercialmente disponible.

Las dosis de EGCG (epigallocatequina) son típicamente de 25 mg - 600 mg de EGCG al día por persona como extracto de té verde. Está comercialmente disponible.

40 Los siguientes Ejemplos no limitantes se presentan para ilustrar mejor la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Se adquirieron PGC-1 $\alpha$  anti-conejo y PPAR- $\gamma$  anti-conejo de Santa Cruz (California, EE.UU.); anti- $\alpha$ -tubulina de

Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.); Mito-Tracker Green FM, complejo antioxidativo I, II, III y V de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.); Mezcla Maestra PCR VERDE SYBR® de ABI (Warrington, RU); placa de BD Oxygen Biosensor System de BD Biosciences (California, EE.UU.); Hidroxitirosol (DSM Nutritional Products); se sintetizaron bucle D mitocondrial y cebadores ARN18s por Bioasia Biotech (Shanghai, China), otros reactivos para cultivo celular fueron de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.).

#### Cultivo celular y diferenciación de adipocitos

Se cultivaron pre-adipocitos 3T3-L1 de Murina (Colección de Cultivos de Tipo Americano) en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10% y se permitió que alcanzaran la confluencia. Se inició la diferenciación de los preadipocitos con insulina 1  $\mu$ M, dexametasona 0,25  $\mu$ M y 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM en DMEM, enriquecido con suero fetal bovino al 10%. Después de 48 h, se reemplazó el medio de cultivo con DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10% e insulina 1  $\mu$ M. Se cambió el medio de cultivo cada dos días con DMEM que contenía suero fetal bovino al 10%. Se usaron células 9-10 días después de inducción de diferenciación cuando presentaban fenotipo de adipocitos del 90%.

#### Determinación de la masa mitocondrial

Se tripsinizaron los adipocitos y se centrifugó a 105 rad/s (1.000 rpm) a 4°C durante 5 min, se volvieron a suspender en disolución Ringer de Krebs tamponada con HEPES y BSA al 0,1%, después se incubó con 0,1  $\mu$ M MitoTracker Green FM en DMEM durante 30 min a 37°C. Se centrifugaron las células a 105 rad/s (1.000 rpm) a 4°C durante 5 min y se volvieron a suspender en 400  $\mu$ l de disolución fresca de Ringer de Krebs tamponada con HEPES. Para examinar la coloración mitocondrial relativa en las fracciones, se cargaron  $20 \times 10^3$  células etiquetadas de Mitotracker en 200  $\mu$ l de cada fracción en una placa de 96 pozos y se leyó la intensidad de fluorescencia relativa (excitación  $485 \pm 25$  nm; emisión  $538 \pm 25$  nm) usando un espectrofotómetro de microplacas de fluorescencia (Sonda molecular). Los resultados se expresan como número de veces de aumento de la intensidad de fluorescencia sobre células de control no tratadas. Los valores son media  $\pm$  DE de los resultados de cuatro experimentos independientes.

#### Método Western

Después del tratamiento, se lavaron las células dos veces con PBS enfriado en hielo, se lisaron en tampón de muestra (Tris-Cl 62,5 mM pH 6,8, SDS al 2%, DTT 5 mM) a temperatura ambiente y se sometieron a agitación vorticial. Después se hirvieron los lisados celulares durante 5 minutos y se aclararon por centrifugación (1.361 rad/s (13.000 rpm), 10 minutos a 4°C). Se determinó la concentración de proteínas usando el ensayo de proteínas Bio-Rad DC. Los lisados solubles (10  $\mu$ g por línea) se sometieron a SDS-PAGE al 10%, después se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con leche desnatada al 5%/TBST durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubaron las membranas con anticuerpos primarios dirigidos frente a PPAR- $\gamma$  (1:1.000), PGC-1 $\alpha$  (1:1.000),  $\alpha$ -tubulina (1:10.000), Complejo I (1:2.000), Complejo II (1:2.000), Complejo III (1:2.000) y Complejo V (1:2.000) en leche al 5%/TBST a 4°C durante la noche. Después de lavar las membranas con TBST tres veces, se incubaron las membranas con anticuerpo secundario conjugado de peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente. Se desarrollaron los métodos Western usando ECL (Roche Mannheim, Alemania) y se cuantificaron por densitometría de barrido.

#### Medición de la respiración en adipocitos.

Se midió el consumo de oxígeno por células intactas como una indicación de la actividad de respiración mitocondrial. El Sistema Biosensor de Oxígeno de BD™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) es un compuesto fluorescente sensible al oxígeno (cloruro de tris-1,7-difenil-1,10 fenantrolina rutenio (II)) embebido en un gas permeable y matriz hidrófoba unida de manera permanente al fondo de una placa multipozos. La concentración de oxígeno en las proximidades del tinte está en equilibrio con la del medio líquido. El oxígeno enfría rápidamente el tinte de una manera dependiente de la concentración predecible. La cantidad de fluorescencia se correlaciona directamente con la proporción de consumo de oxígeno en el pozo, que a su vez se puede relacionar con cualquier tipo de reacción que pueda ligarse a consumo de oxígeno. La única tecnología permite la detección instantánea homogénea de los niveles de oxígeno. Después de tratamiento, se lavaron los adipocitos en tampón KRH más BSA al 1%. Las células de cada condición se dividieron en alícuotas en una placa del Sistema Biosensor de Oxígeno BD (BD Biosciences) por triplicado. Se sellaron las placas y "se leyó" en un espectrómetro de Fluorescencia (Sondas moleculares) a intervalos de 1 minuto durante 60 minutos a una longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 630 nm. El número de células contenido en volúmenes iguales no fue estadísticamente significativo entre las condiciones (Wilson-Fritch et al., 2004 J Clin Invest 114: 1.281-1.289).

#### Medición de ADN mitocondrial.

Se realizó PCR cuantitativo en sistema PCR de Tiempo Real Mx3000P (Stratagene). Las reacciones se realizaron primero con 12,5  $\mu$ l de Mezcla Maestra Verde SYBR (ABI), 0,5  $\mu$ l de cada cebador (10  $\mu$ M), 100 ng de plantilla (ADN) o no plantilla (NTC) y se añadió agua sin ARNs a un volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de ciclación fueron como sigue: 50°C durante 2 min, desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 1 min y 72°C durante 30 s. Cada PCR cuantitativo se realizó por triplicado. Se

usaron los siguientes cebadores:

bucle-D mitocondrial sentido directo, 5'-AATCTACCATCCTCCGTG-3' (SEC ID N° 1) invertido 5'-GACTAATGATTCTTCACCGT (SEC ID. N° 2)

5 ARN18s sentido directo: 5'-CATTGGAACGTCTGCCCTATC-3' (SEC ID. N° 3) e invertido: 5'-CCTGCTGCCTTCCTTGA-3' (SEC ID. N° 4)

El gen de ARNr 18S sirvió como el gen de referencia endógeno. Se realizó la curva de fusión para asegurar la multiplicación específica. El método de curva estándar se usó para cuantificación relativa. Se calculó después la relación de bucle D mitocondrial a ARNr 18S. Los resultados finales se presentan como porcentaje de control.

10 Análisis para actividades de complejo mitocondrial I, II y III.

Se cultivaron adipocitos en placas de 100 mm, se lavaron en PBS, se volvieron a suspender en un tampón isotónico apropiado (sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 5 mM, pH 7,5 y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM) y se homogeneizaron. Se aislaron las mitocondrias por centrifugación diferencial de los homogenados celulares. Se ensayaron de manera espectrofotométrica NADH-CoQ oxidorreductasa (Complejo I), succinato-CoQ oxidorreductasa (complejo II), CoQ-citocromo c reductasa (complejo III) usando los ensayos convencionales (Picklo y Montine, 2.001 *Biochim Biophys Acta* 1.535: 145-152; Humphries, K. M. y Szveda, L. I. 1.998 *Biochemistry* 37: 15.835-15.841), con modificaciones insignificantes

Análisis para analizar la expresión de ARNm de Cpt1a.

20 3T3-L1. Se trataron los adipocitos durante 48 h con HT a 0,1; 1,0; 10 y 50  $\mu$ moles/l y se aisló ARN total. Se analizó la expresión de Cpt1a por RT-PCR usando las condiciones descritas en Shen W, Liu K, Tian C, et al. ácido R- alfa-lipoico y acetil-L: -carnitina activan de manera complementaria la biogénesis mitocondrial en adipocitos 3T3-L1 murinos. *Diabetologia* 2.008; 51: 165-174.

El número de ciclos a los que fueron detectables las diversas transcripciones se comparó con el de ARNr 18S como control interno.

25 Análisis estadístico

Todos los datos cualitativos fueron representativos de al menos tres experimentos independientes. Los datos se presentan como medias  $\pm$  DE. Se determinó la significancia estadística usando ANOVA unidireccional con ensayos post hoc de Bonferroni entre los dos grupos. El criterio para la significancia se fijó a  $p < 0,05$ .

### Resultados:

30 Efecto de Hidroxitirosol sobre el nivel de proteína PGC-1 $\alpha$  en adipocitos.

Como se muestra en la Figura 1, el hidroxitirosol mostró un efecto en forma de campana en PGC-1 $\alpha$  creciente de 0,1 a 10,0  $\mu$ M con una expresión de proteína máxima a 1,0  $\mu$ M ( $205 \pm 52\%$ ,  $p < 0,05$  frente a control).

Efecto de hidroxitirosol sobre expresión de proteínas de complejo I, II, III y V en adipocitos.

35 Se determinaron los complejos mitocondriales por métodos western (Figura 2A a D). Se observó un aumento en proteína de complejo I de transporte de electrones mitocondriales con tratamiento con hidroxitirosol a 0,1  $\mu$ M ( $131 \pm 16\%$ ,  $p < 0,05$  frente a control), 1,0  $\mu$ M ( $163 \pm 31\%$ ,  $p < 0,01$  frente a control) y 10,0  $\mu$ M ( $138 \pm 21\%$ ,  $p < 0,05$  frente a control) (Figura A). La expresión de proteína de complejo II aumentó también significativamente con hidroxitirosol a 0,1; 1,0 y 10,0  $\mu$ M (Figura B). La expresión de proteína de complejo III y V aumentó significativamente con hidroxitirosol a 0,1; 1,0 y 10,0  $\mu$ M (Figura C y D).

40 Efectos de hidroxitirosol en ADN mitocondrial

Como el bucle D se conoce como el sitio principal de iniciación de la transcripción en las cadenas tanto pesadas como ligeras de ADNmt, se examinó in vitro si hidroxitirosol podía aumentar la expresión de ADNmt. Como se muestra en la Figura 3, la relación de bucle-D mt /ARN18s aumentó significativamente en los adipocitos tratados con hidroxitirosol a 1,0  $\mu$ M.

45 Efecto de Hidroxitirosol sobre el consumo de oxígeno en adipocitos.

Para determinar si la biogénesis mitocondrial aumentada va acompañada de cambios en el consumo de oxígeno, se trataron células con hidroxitirosol a 0,1; 1,0, 10 y 50,0  $\mu$ M. Como se muestra en la Figura 4, la relación basal de consumo de oxígeno aumentó significativamente en los adipocitos tratados con hidroxitirosol a 1,0-10,0  $\mu$ M.

Efecto de Hidroxitirosol sobre las actividades del complejo I, II, III, IV y V mitocondrial.

Hidroxitirosol mostró un aumento significativo en la actividad de complejo I mitocondrial en células de adipocitos a 1,0  $\mu\text{M}$  relativo respectivamente a control (Figura 5A). La actividad de complejo II mitocondrial aumentó significativamente con hidroxitirosol a 0;1; 1;0 y 10;0  $\mu\text{M}$  (Figura 5B). Hidroxitirosol también presentó un aumento significativo en la actividad de complejo III, IV y V mitocondrial en células de adipocitos a 0,1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  (Figura 5C, 5D y 5E).

5

Efecto de Hidroxitirosol sobre la expresión de genes Cpt1

CPT-1 es el garante de oxidación de ácidos grasos mitocondriales debido a que regula el transporte de ácidos grasos de cadena larga por la membrana mitocondrial convirtiendo acil-CoA en acilcarnitina. HT mostró un aumento dependiente de la dosis en expresiones de ARNm Cpt1 aumenta significativamente a 1,0  $\mu\text{mol/l}$  de HT.

10 En resumen, el hidroxitirosol fomenta la actividad mitocondrial y la biogénesis mitocondrial conduciendo a una mejora de la función mitocondrial y el sistema de defensa celular.

Ejemplo 2

Efecto de Hidroxitirosol sobre la resistencia.

15 El fin del estudio fue determinar el efecto de hidroxitirosol sobre la realización de carrera máxima en una banda sin fin.

En resumen, se adquirieron cuarenta ratones (C57BL/6NCrI; 8 semanas) de Charles River (Sulzfeld, Alemania) y se alojaron individualmente con acceso libre a agua y pienso, con un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas alterno. Se alimentaron los animales con una dieta para roedores clásica (Ssniff R/M-H, Ext. n° V1536, Ssniff Ltd., Soest, Alemania). Después de 2 semanas de adaptación a la dieta se aleatorizaron los ratones según el peso corporal en cuatro grupos experimentales de 10 animales. Los cuatro grupos fueron tratados por vía oral cada mañana durante 3 semanas con agua (grupo de control) o con un extracto de oliva diluido a 0,2 ml con agua y que contenía hidroxitirosol al 50% a dosis de 50, 150 ó 300 mg/kg de peso corporal al día. No hubo diferencia en el consumo de pienso por todo el experimento. Después de 3 semanas de tratamiento, se midió la distancia de carrera máxima en una banda sin fin. La significancia estadística de las diferencias de medias entre grupos dietarios se ensayó por análisis unidireccional de la varianza (ANOVA). Si se encontraron diferencias significativas, se usó el ensayo Dunnett para comparación múltiple para comparar cada grupo con el grupo de control. Los valores de P menores que 0,05 se consideraron significativos. El hidroxitirosol aumentó significativamente la distancia de carrera a agotamiento de los ratones y así mejoró la resistencia en el ejercicio prolongado.

20

25

30

La FIGURA 7 muestra el efecto de Hidroxitirosol, proporcionado como un extracto de oliva que contiene hidroxitirosol al 50% a dosis de 50, 150 ó 300 mg/kg de peso corporal al día por sonda nasogástrica, aumenta la resistencia por hasta 50% en ratones después de 3 semanas de suplemento.

Ejemplo 3

La bebida energética contiene 50 mg de hidroxitirosol y 100 mg de cafeína / porción.

Ejemplo 4

35 Un suplemento para deportistas contiene 20 g de creatina y 100 mg de hidroxitirosol.

Ejemplo 5

Un suplemento para composición de modelamiento corporal /quema de grasas/ mejora corporal contiene 500 mg de carnitina y 25 mg de hidroxitirosol/ día y persona.

Ejemplo 6

40 Una toma energética, por ejemplo 5 horas, contiene hidroxitirosol además de vitaminas B, taurina, glucuronolactona, cafeína (o descafeinado, citicolina, ácido málico, N-Acetiltilrosina, L-Fenilalanina).

Ejemplo 7

Una barrita de chocolate contiene 25 mg de hidroxitirosol y 25 mg de EGCG por 25 g de chocolate.

Ejemplo 8

45 Una bebida para deportistas instantánea contiene 5 g de creatina, 50 mg de CoQ10 y 50 mg de hidroxitirosol.

Ejemplo 9

Una barra energética contiene 5 mg de resveratrol y 5 mg de hidroxitirosol.

Ejemplo 10

Una bebida preparada de té con hielo (que contiene así EGCG) se fortifica con 12,5 mg de hidroxitirosol y 5 mg de resveratrol por 240 ml (8 fl oz.).

5 Ejemplo 11

Se fortifica zumo de manzana (que contiene así quercetina) con 12,5 mg de hidroxitirosol y 5 mg de resveratrol por 240 ml (8 fl oz.).

Ejemplo 12

10 Una bebida para deportistas preparada se fortifica con 15 mg de hidroxitirosol, 2,5 mg de resveratrol, 50 mg de quercetina y 25 mg de EGCG por 240 ml (8 fl oz.).

Ejemplo 13

Una toma energética se fortifica con 25 mg de hidroxitirosol, 200 mg de cafeína y 100% de RDA de vitaminas B1, B2, B3, B5, biotina y B12 por 60 ml (2 fl oz.).

Ejemplo 14

15 Una mini-toma energética se diseña como pralina líquida / café de bolsa y se fortifica con 25 mg de hidroxitirosol, 200 mg de cafeína y 100% RDA de vitaminas B1, B2, B3, B5, biotina y B12 por 60 ml (2 fl oz.).

Ejemplo 15

Efectos sinérgicos de Hidroxitirosol en asociación con otros compuestos.

20 El objetivo del experimento fue investigar si y cómo se veía afectada la producción de energía mitocondrial en los mioblastos por hidroxitirosol sólo o en asociación con otros compuestos. Para la producción de energía, la cadena de transporte de electrones mitocondrial genera un gradiente de protones por el espacio intermembrana mitocondrial, creando un potencial de membrana que activa la síntesis de ATP por el complejo de ATP sintasa. Por lo tanto, el potencial de membrana mitocondrial es indicativo de la producción de energía mitocondrial activa. El compuesto fluorescente verde catiónico JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina) absorbido por las mitocondrias de manera proporcional al potencial de membrana mitocondrial interno. Si se alcanza una concentración crítica, JC-1 forma agregados, que cambia sus propiedades de fluorescencia de fluorescencia verde a roja. Por lo tanto, la relación de fluorescencia roja (agregado) a verde (monomérica) es directamente proporcional al potencial de membrana mitocondrial en células coloreadas y sirve como indicador para la salud general y la función de las mitocondrias. Un potencial de membrana mitocondrial aumentado indica un estado energético mejorado y una capacidad mejorada para generar ATP y proporcionar energía para otros componentes celulares.

35 Se examinó el efecto de hidroxitirosol, cafeína, L-carnitina o la asociación de hidroxitirosol con cafeína o L-Carnitina sobre el potencial de membrana mitocondrial en mioblastos de ratón C2C12. Se sembraron células C2C12 en una placa de cultivo de células de 96 pozos a 1.000 células/pozo y se cultivaron en medio de crecimiento (medio eagle modificado de Dulbecco (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10%) en una incubadora estándar (humidificada, 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%) durante 24 h. Después se incubaron las células con medio de cultivo que contenía a) disolvente de control (disolución salina tamponada de fosfato), b) hidroxitirosol 1 uM, c) cafeína 200 uM, d) L-carnitina 200 uM, e) hidroxitirosol 1 uM + cafeína 200 uM o f) hidroxitirosol 1 uM + L-carnitina 200 uM. El ribonucleótido de aminoimidazol-carboxamida activador de cinasa AMP (AICAR) es conocido que afecta a la producción de energía mitocondrial y sirve como control positivo (500 uM). Después de 24 h de tratamiento, se incubaron las células con medio que contenía JC-1 (2 ug/ml) durante 30 min a 37°C, después se retiró la disolución coloreada, se añadió DMEM sin rojo de fenol y se midieron la fluorescencia verde (ex 485 nm/em 538 nm) y la fluorescencia roja (ex 544 nm/em 590 nm) usando un lector de placas de fluorescencia (SpectraMax M5). Se determinó la relación de fluorescencia roja a verde en cada pozo y se calculó el promedio y la desviación estándar de los tratamientos por cuadruplicado.

45 El tratamiento de las células C2C12 con AICAR afectó a la producción de energía celular, produciendo un aumento en el potencial mitocondrial que se refleja por un aumento en relación de fluorescencia roja/verde (Fig. 8A). El tratamiento de las células con hidroxitirosol (HT) 1 uM no tuvo efecto significativo, mientras que el tratamiento con HT 10 uM aumentó el potencial mitocondrial (Fig. 8A). El tratamiento con cafeína 200 uM o L-carnitina 200 uM sólo no presentó efecto significativo sobre el potencial de membrana mitocondrial (Fig. 8B). Sin embargo, cuando se emplearon los compuestos en concentraciones equivalentes pero en asociación con HT 1 uM, se observó un efecto sinérgico sobre el potencial de membrana mitocondrial. El tratamiento de las células C2C12 con la asociación de hidroxitirosol y cafeína o la asociación de hidroxitirosol y L-carnitina aumentó el potencial de membrana mitocondrial por 15% y 14%, respectivamente. Este efecto fue comparable al efecto observado con AICAR (+16%) (Tabla I, a

continuación).

Tabla I: Aumento del potencial mitocondrial cuando se evalúa por fluorescencia relativa de JC-1

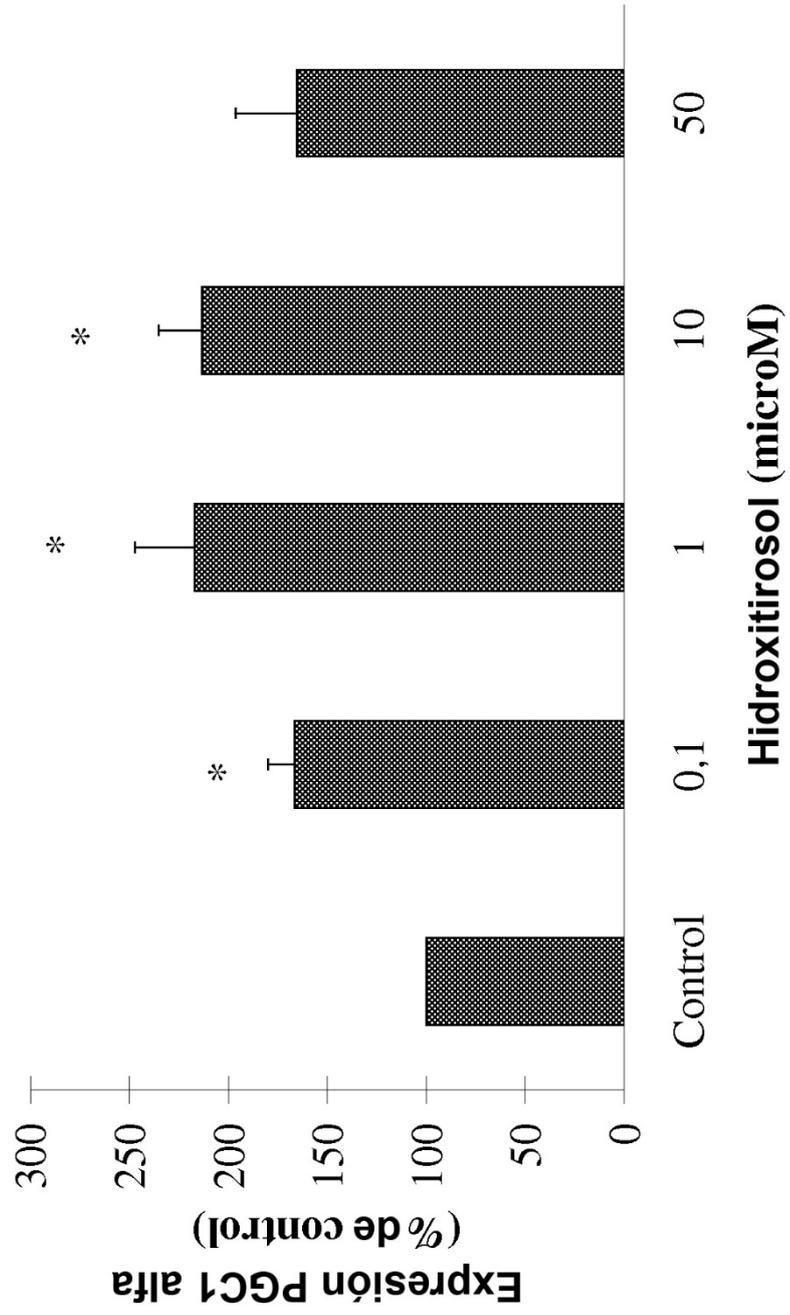
Tratamiento	Aumento en el potencial de membrana mitocondrial
Control	ref.
AICAR 500 $\mu$ M	16%
Hidroxitirosol 1 $\mu$ M	1%
Hidroxitirosol 10 $\mu$ M	11%
Cafeína 200 $\mu$ M	-4%
L-carnitina 200 $\mu$ M	0%
Cafeína 200 $\mu$ M + Hidroxitirosol 1 $\mu$ M	15%
L-carnitina 200 $\mu$ M + Hidroxitirosol 1 $\mu$ M	14%

5 Estos resultados demuestran que la asociación de hidroxitirosol y cafeína y la asociación de hidroxitirosol y L-carnitina aumentan sinérgicamente la función mitocondrial y la producción de energía.

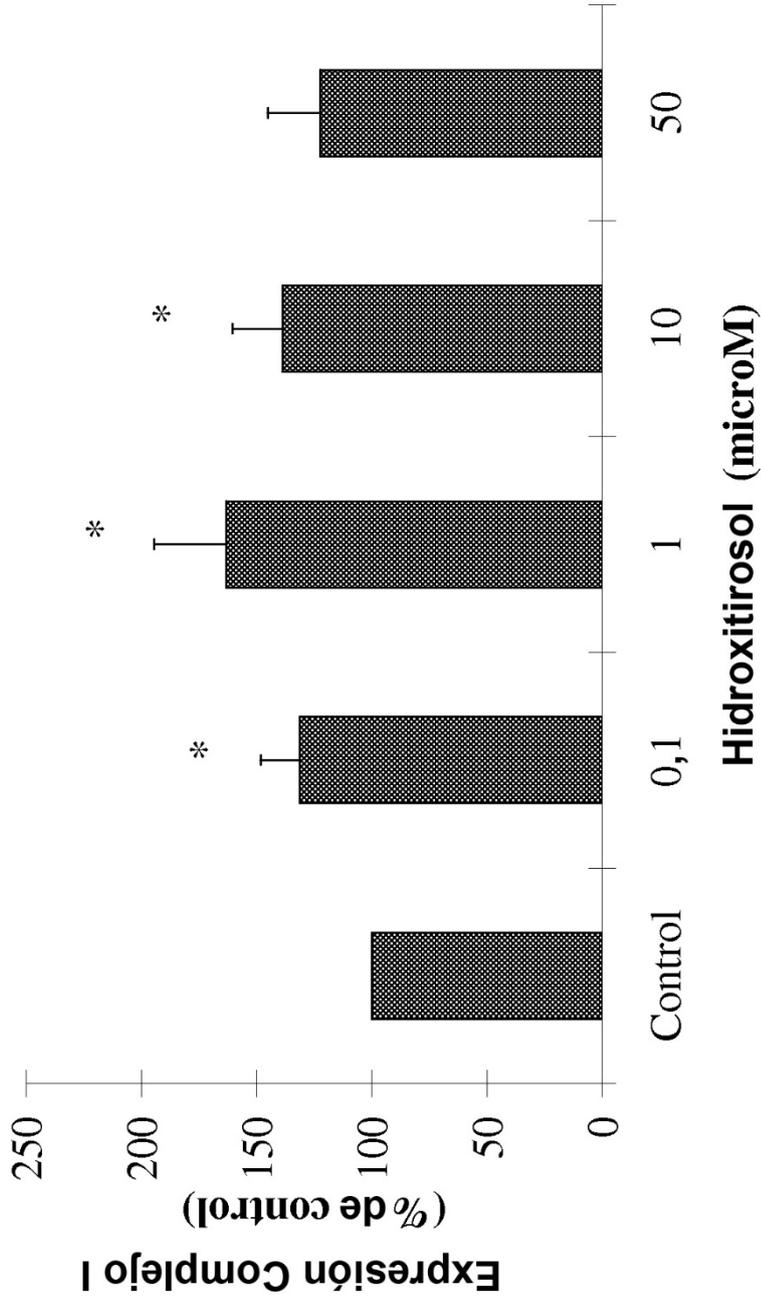
**REIVINDICACIONES**

1. Un nutracéutico o composición alimenticia que comprende hidroxitirosol en asociación con cafeína caracterizado por que la dosis es 10 - 200 mg de hidroxitirosol y 50 - 450 mg de cafeína.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la composición es una composición veterinaria.

FIGURA 1



**FIGURA 2A**



**FIGURA 2B**

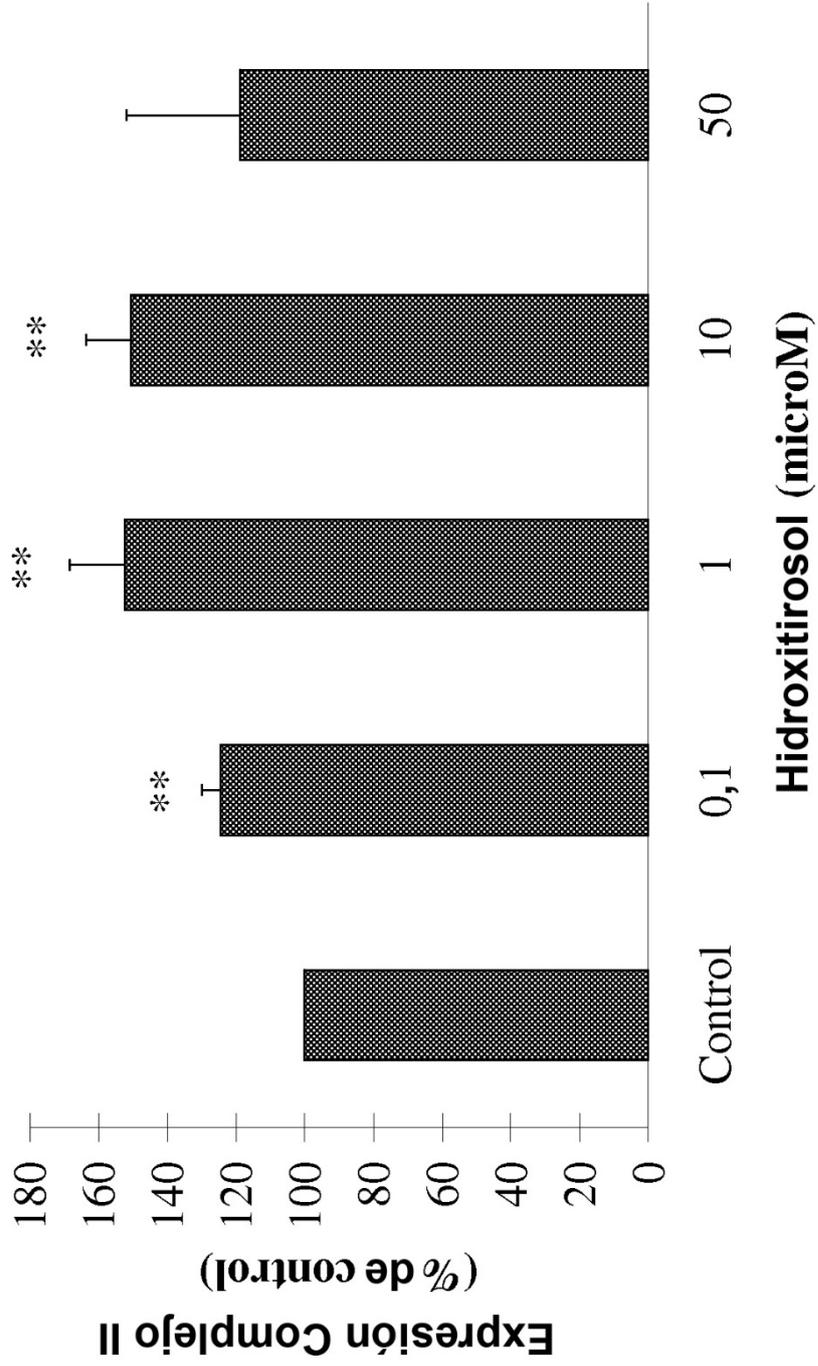
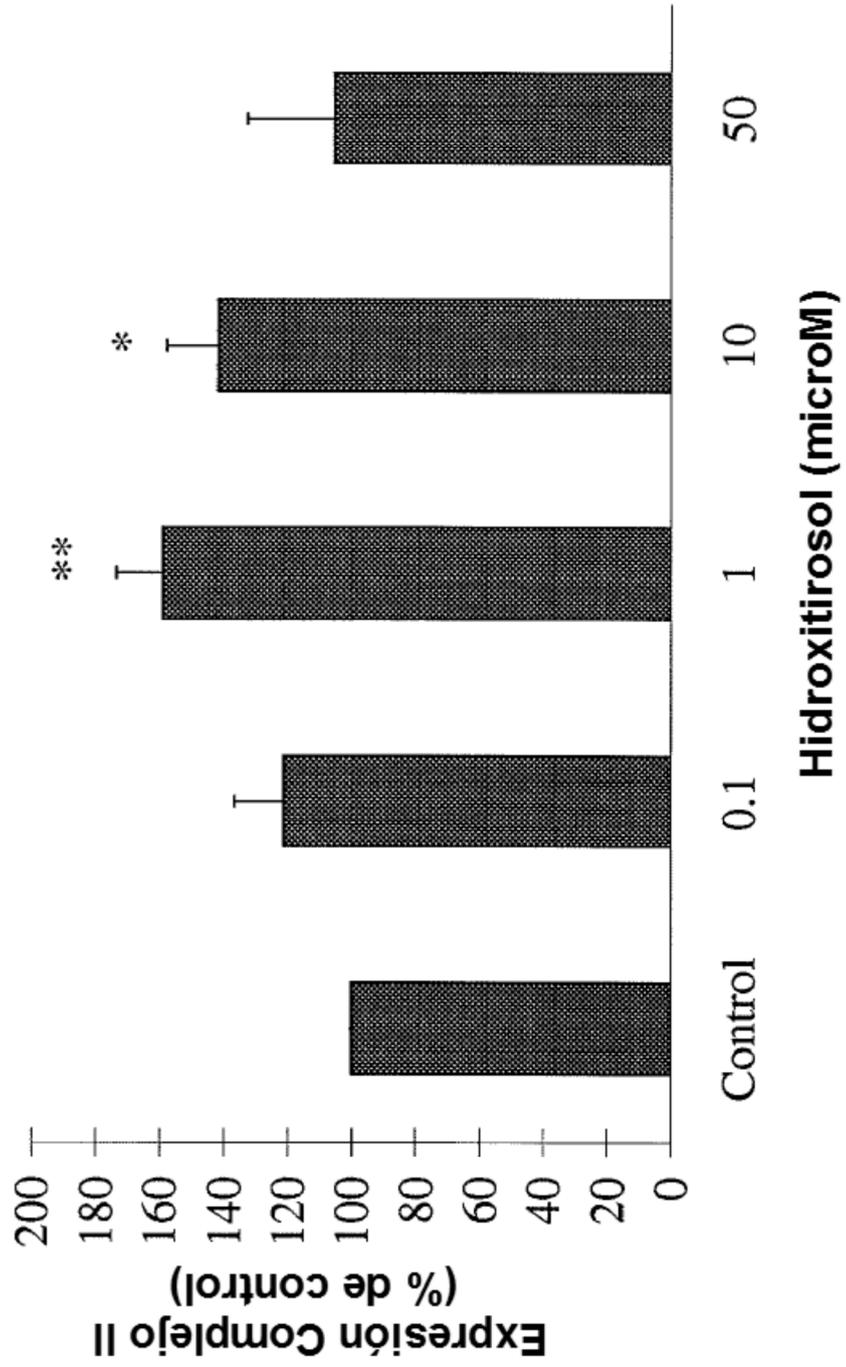
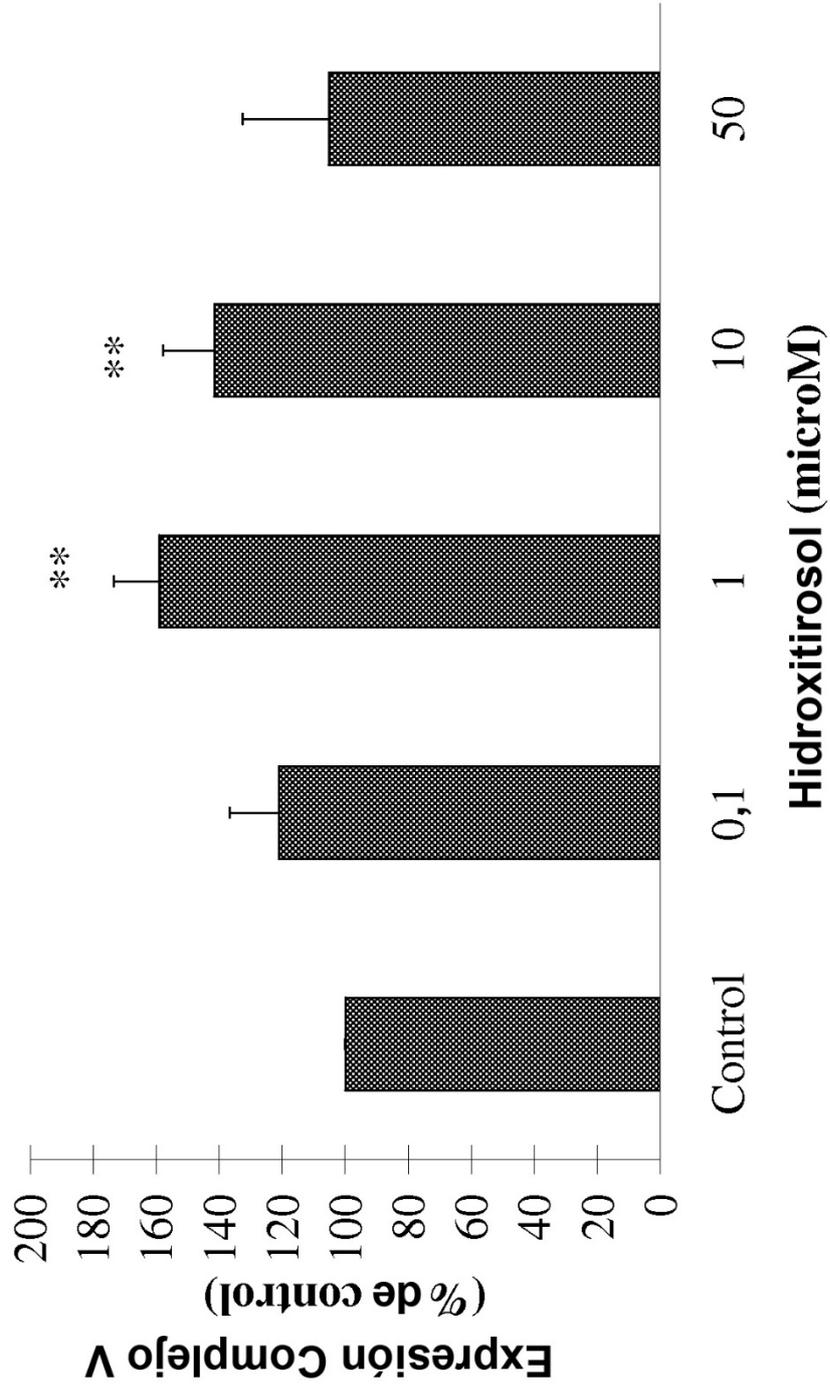


Figura 2C



**FIGURA 2D**



**FIGURA 3**

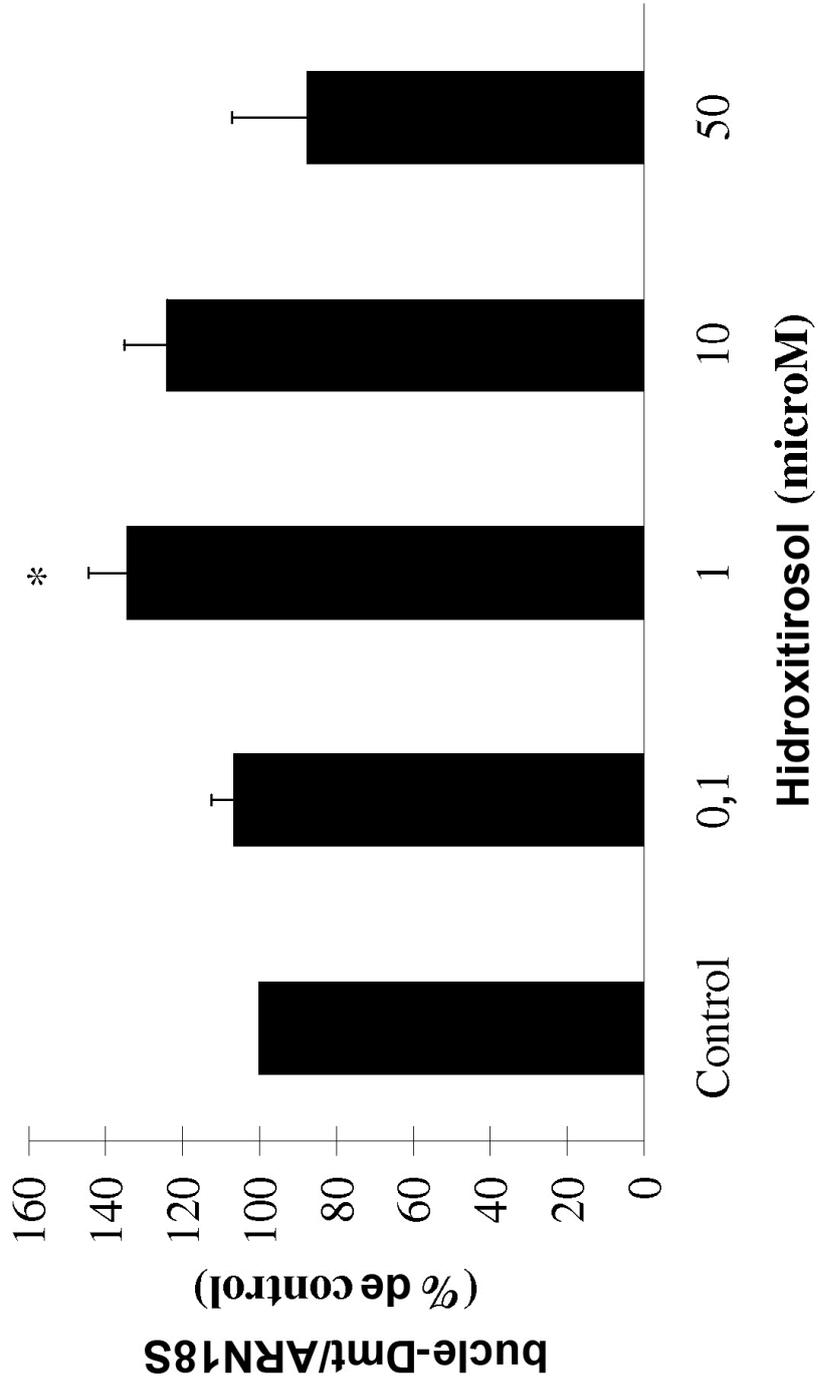
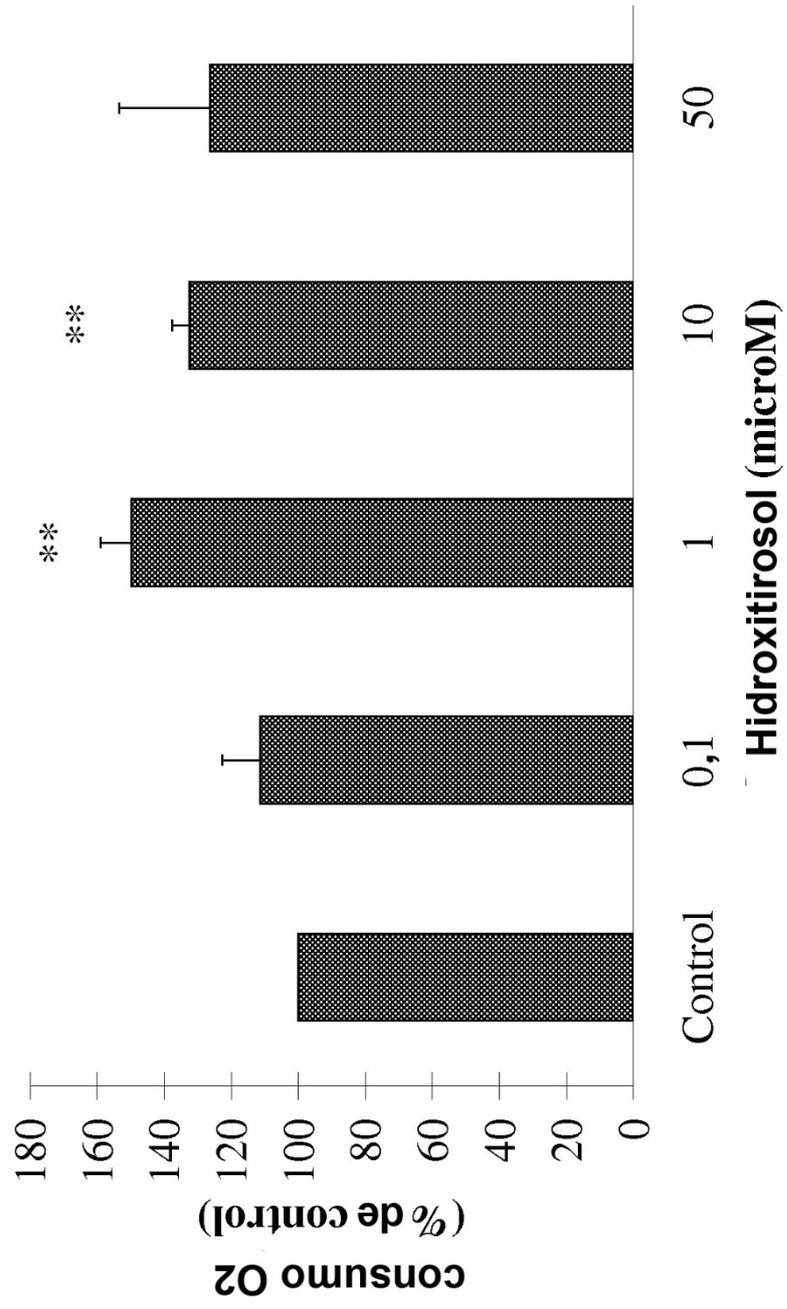
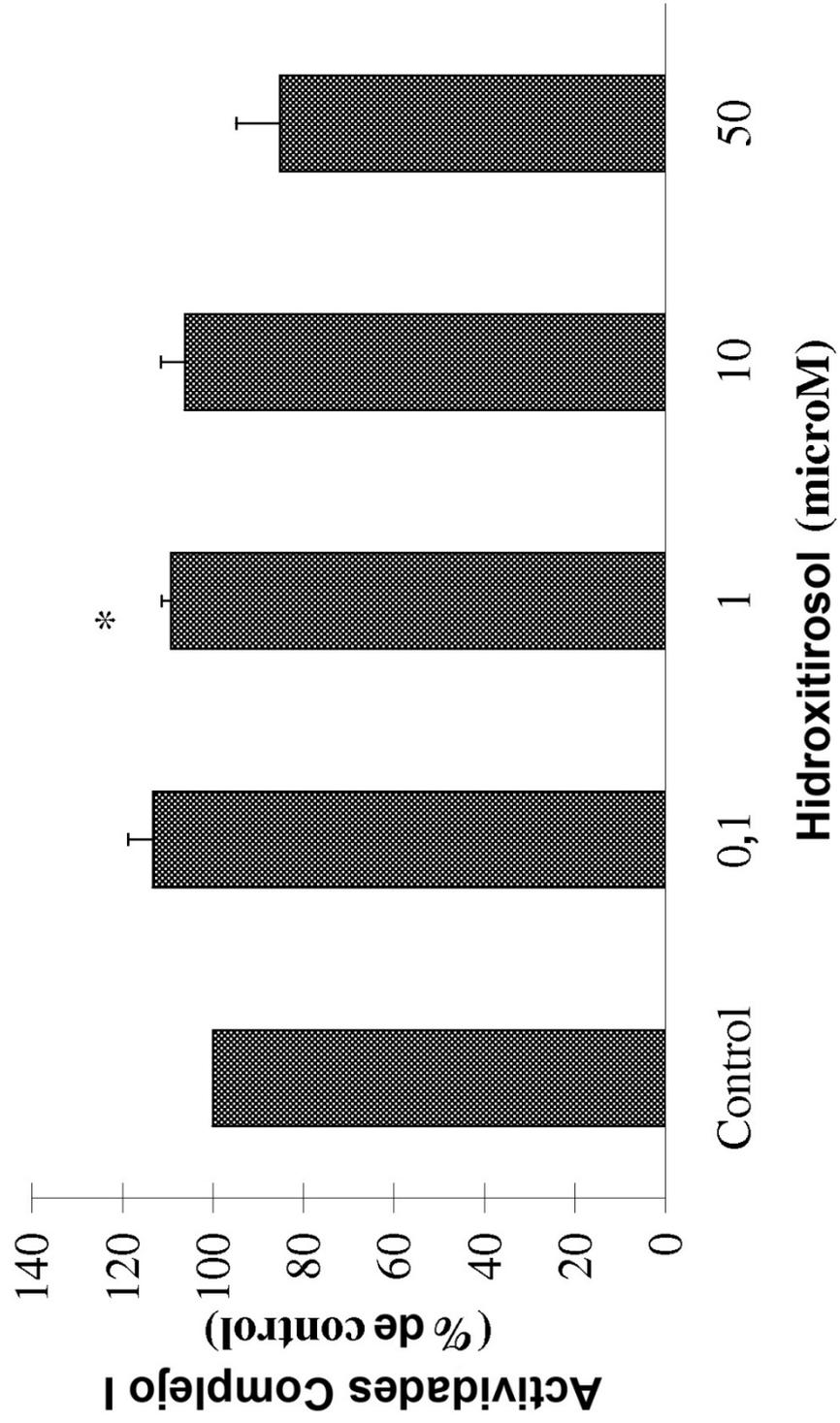


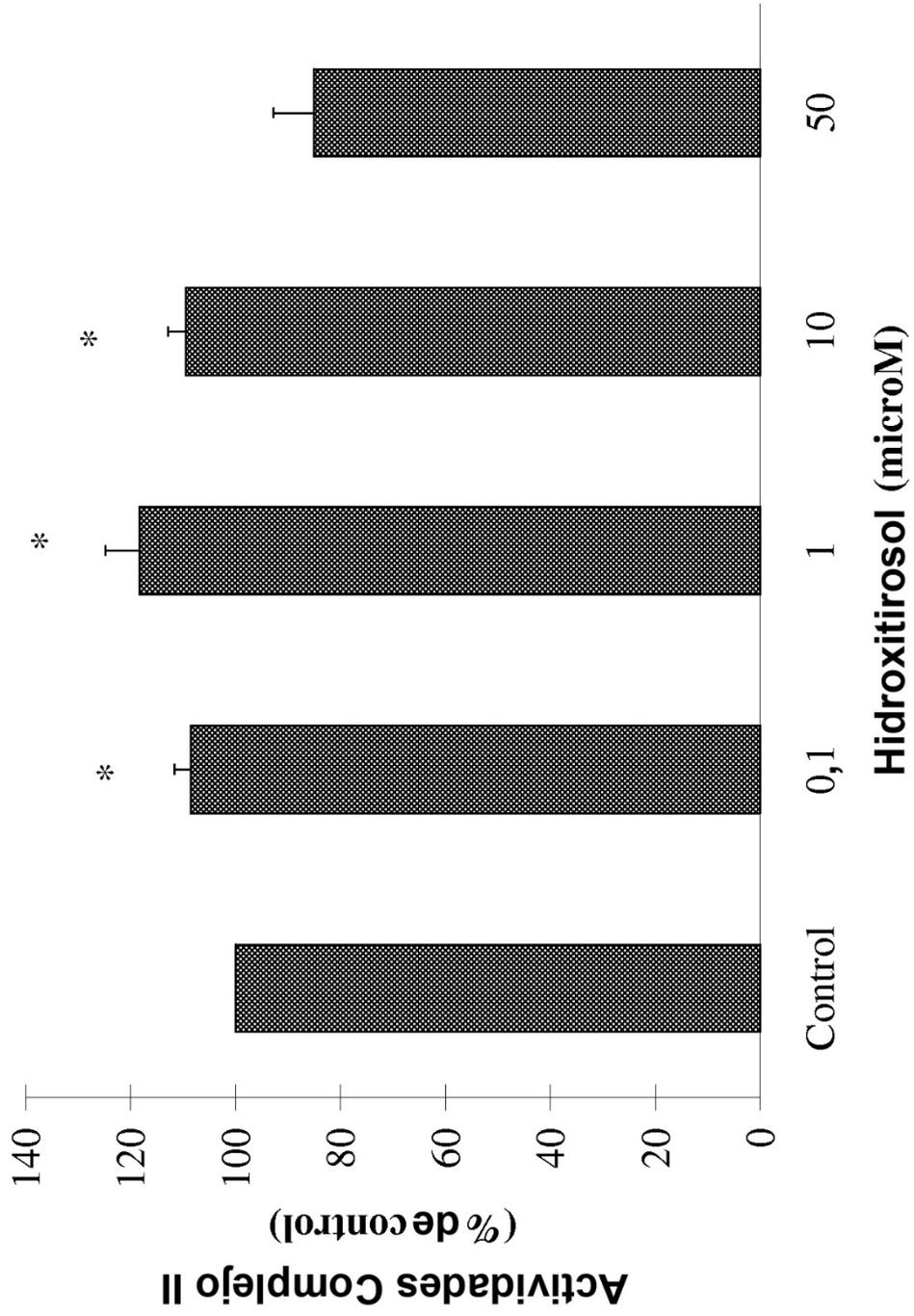
FIGURA 4



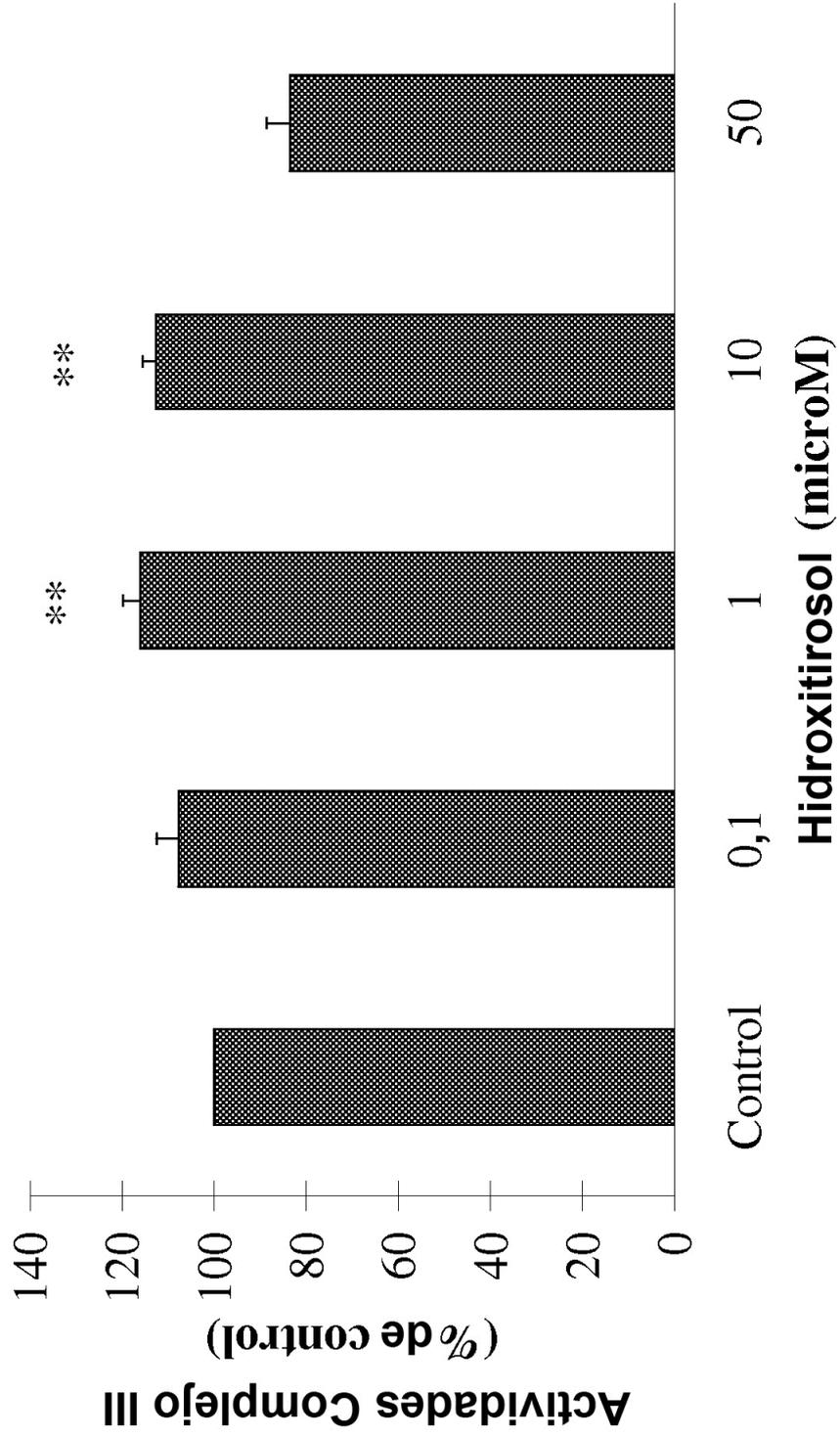
**FIGURA 5A**



**FIGURA 5B**



**FIGURA 5C**



**FIGURA 5D**

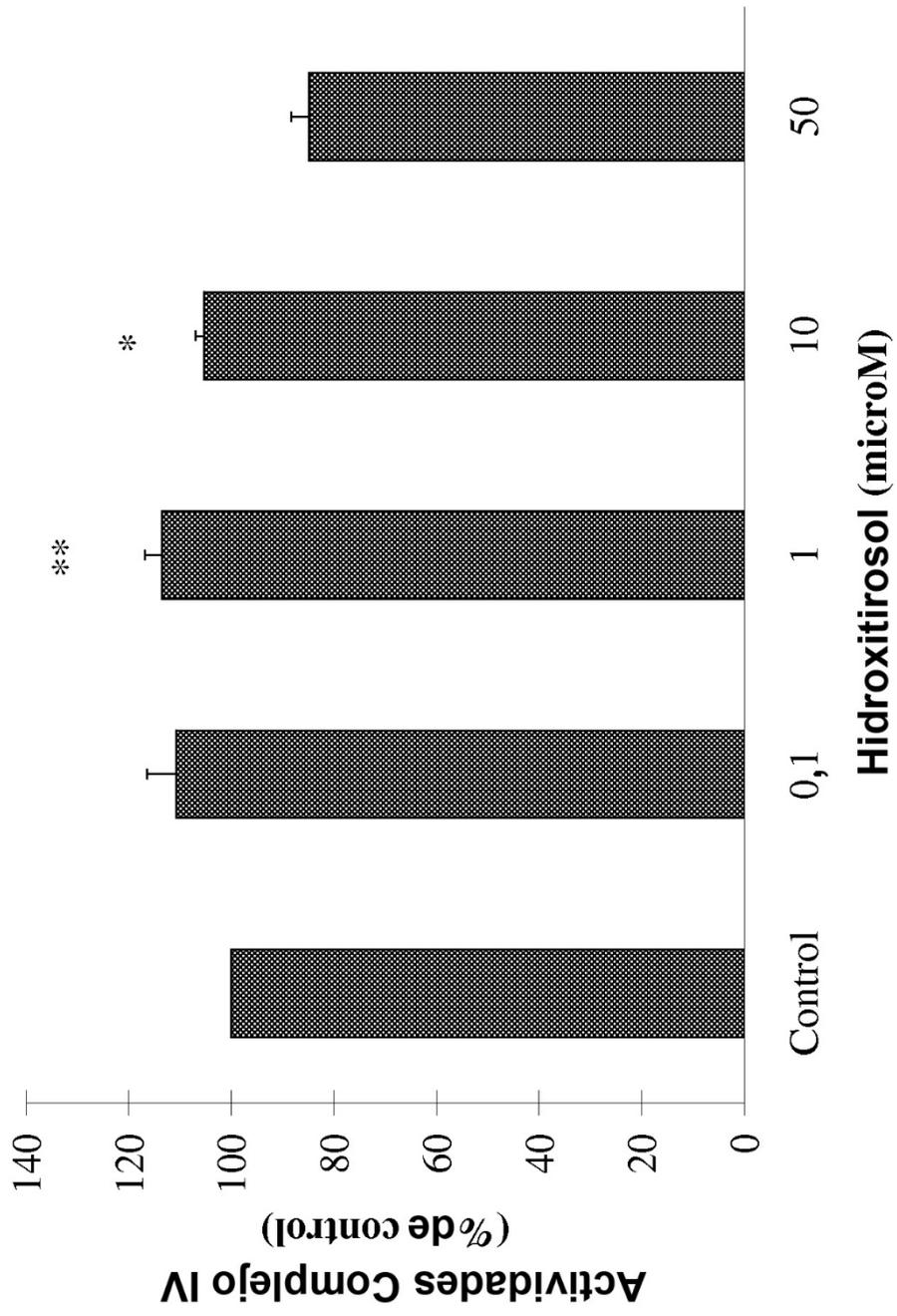
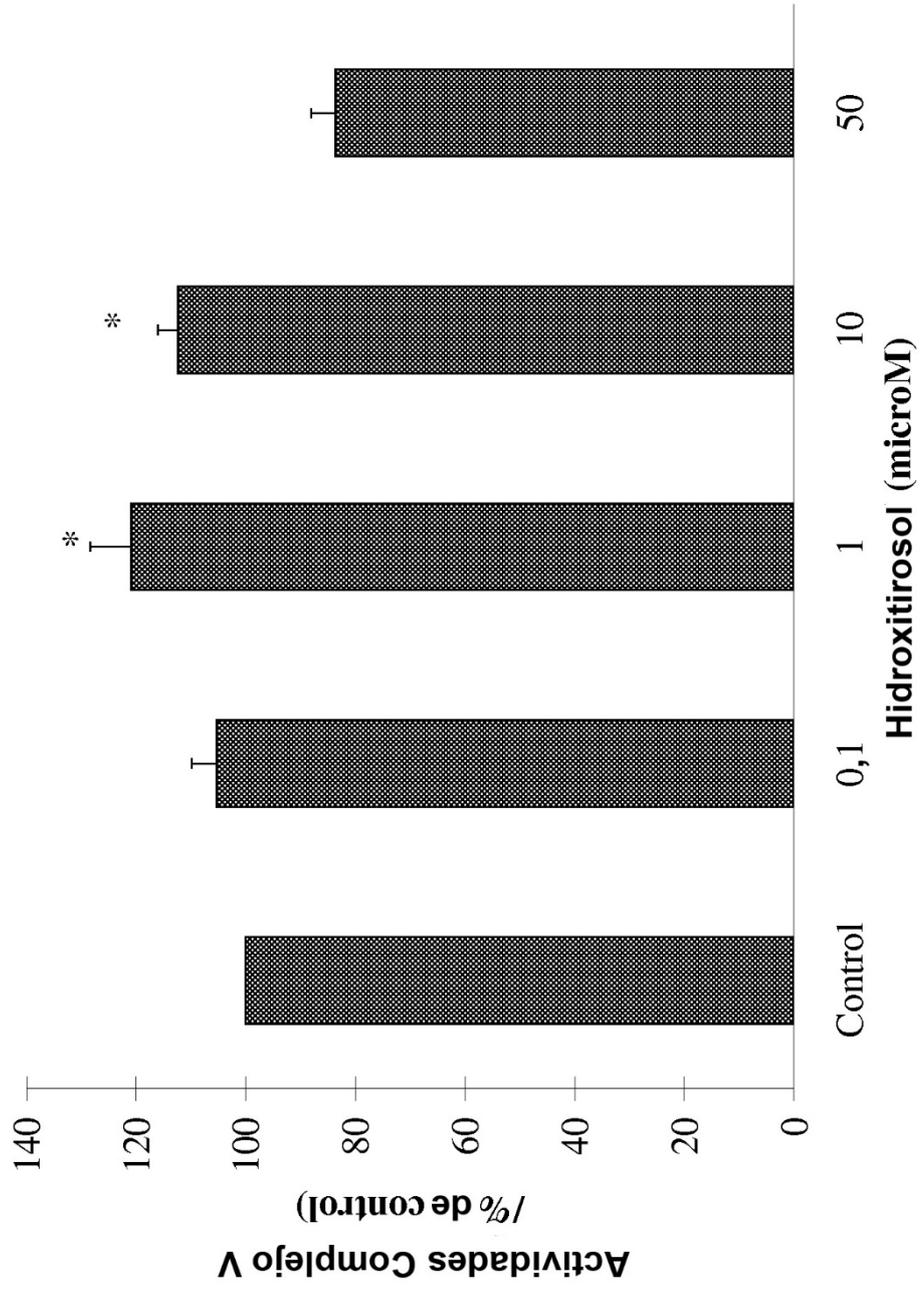


FIGURA 5E



**FIGURA 6**

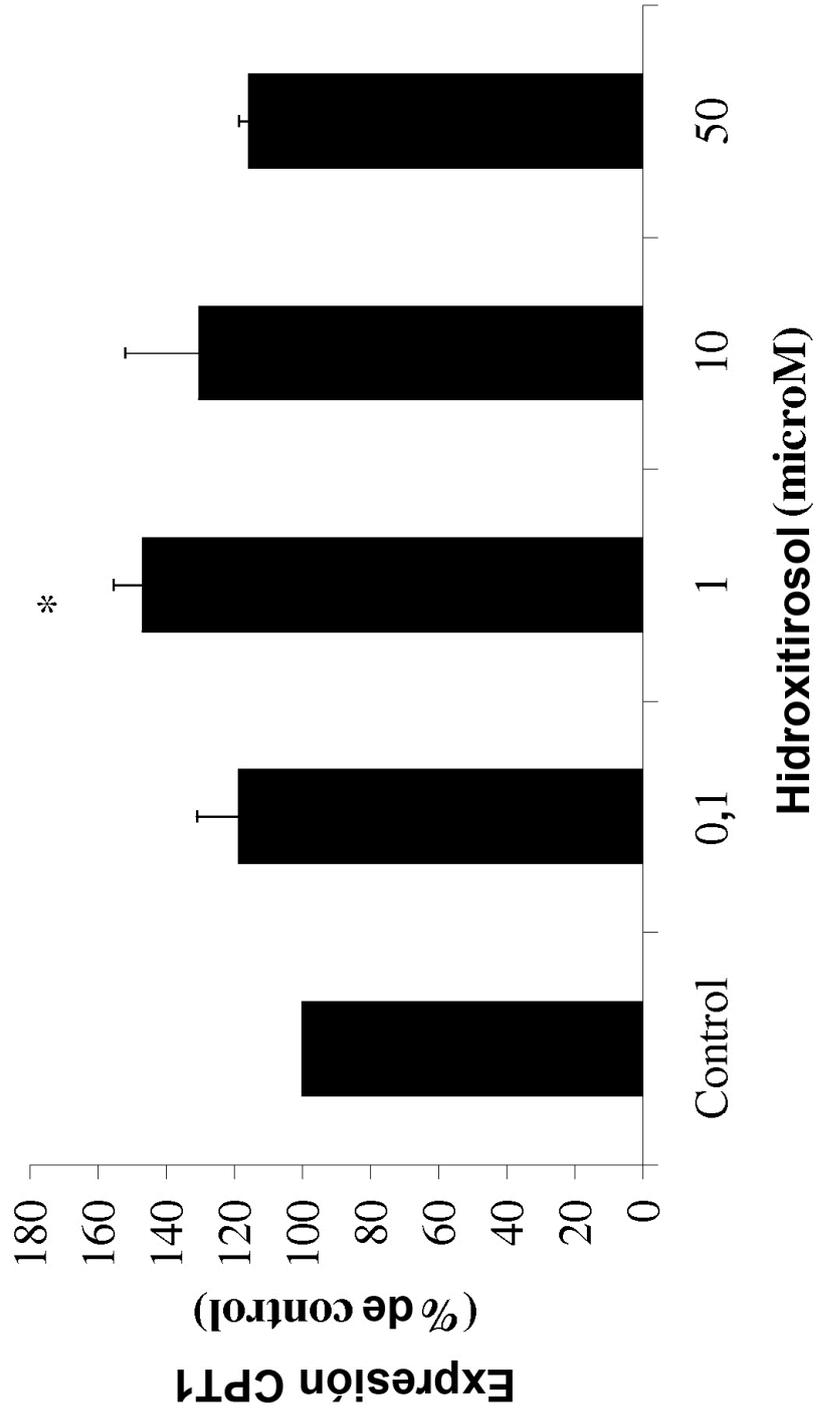


FIGURA 7

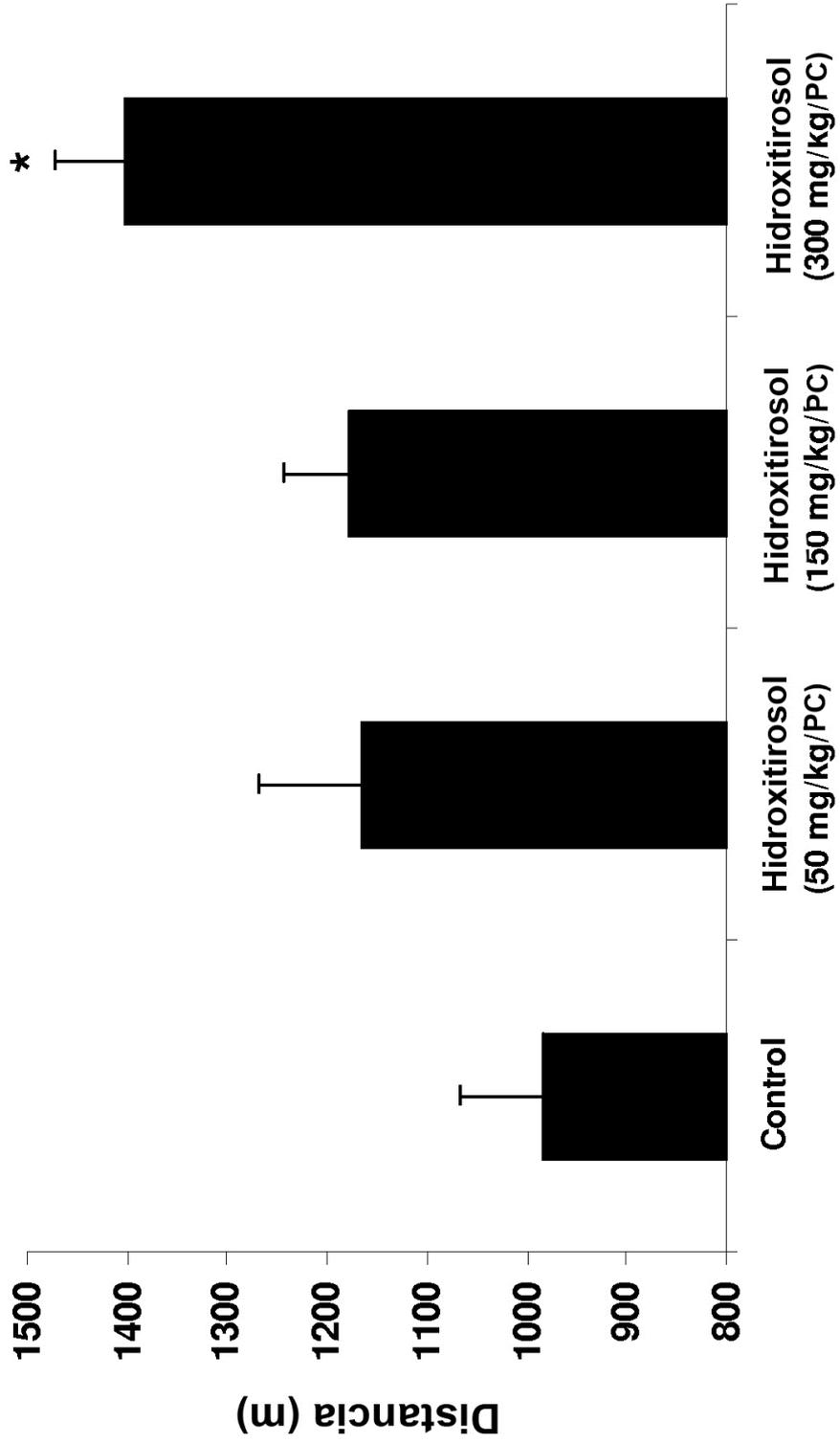


FIGURA 8

