

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 078**

51 Int. Cl.:

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 36/738 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2013 PCT/DK2013/050224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14005597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2013 E 13736751 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2872135**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de escaramujo en polvo**

30 Prioridad:

06.07.2012 DK 201270413
06.07.2012 US 201261668751 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2017

73 Titular/es:

ORKLA HEALTH A/S (100.0%)
Industrigrenen 10
2635 Ishøj, DK

72 Inventor/es:

BRUSTAD, IRENA;
HELLAND, ANITA;
SLEE, EMILY LOUISE;
PINSTRUP, MARTIN STADIL y
HØEG, JOHANNES ARBO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 615 078 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

Procedimiento de fabricación de escaramujo en polvo

5 La presente divulgación se refiere a una composición que comprende escaramujo seco y vitamina C, y a un procedimiento de obtención de dicha composición de escaramujo. Se refiere también al uso de dicha composición en un procedimiento para el mantenimiento de la flexibilidad de las articulaciones y para la reducción de la inflamación. Además, se refiere también a un complejo y al uso de dicho complejo y a la composición para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular osteoartritis.

La invención se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

10 Artritis degenerativa se refiere a un síndrome clínico en el que una inflamación de bajo grado resulta en dolor en las articulaciones, causada por el desgaste anormal del cartílago que recubre y actúa como una almohadilla en el interior de las articulaciones, y la destrucción o disminución del líquido sinovial que lubrica las articulaciones.

En la actualidad, no hay un tratamiento curativo disponible, sin embargo, el tratamiento con agentes anti-inflamatorios ha demostrado ser eficaz, por ejemplo, para aliviar el dolor con pacientes que padecen artritis degenerativa.

15 Se conoce que las formulaciones de escaramujo tienen propiedades anti-inflamatorias y han demostrado también ser eficaces en el tratamiento de los síntomas indicados anteriormente. El documento US 6.024.960 describe una formulación de escaramujo como un agente anti-inflamatorio para aliviar/reducir los síntomas asociados con la inflamación y la artritis. La formulación es preparada a partir de escaramujos en un procedimiento que comprende las etapas de recolección de los escaramujos cuando los escaramujos están maduros, triturar los escaramujos recogidos, secar escaramujos triturados a un contenido de agua máximo del 5% en peso, pasar los escaramujos secados y triturados a través de una etapa de separación en la que se eliminan los frutos secos, los pelos y otras materias extrañas, y moler el material restante en un molino de molienda a un tamaño de partícula menor de 1 mm, tal como de aproximadamente 0,1 a 0,5 mm. La etapa de secado de los escaramujos triturados se realiza a una temperatura inferior a 50°C con aire y evitando la luz solar con el fin de conservar el contenido de vitaminas de los escaramujos. El polvo resultante según el documento US 20 6.024.960 comprende varias vitaminas, tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina E y vitamina K, así como varios minerales, en particular, el escaramujo en polvo contiene un alto contenido de vitamina B, E y C, con 25 aproximadamente 560 mg de vitamina C por cada 100 g de polvo, además de una amplia gama de minerales.

El documento WO 2008/006589 describe también una composición anti-inflamatoria que comprende escaramujos preparados según el procedimiento del documento US 6.024.960 y al menos un componente adicional.

30 Según el documento WO 2008/006589, preferentemente los escaramujos preparados deberían comprender al menos glucósidos de diacilglicerol, tales como 3-beta-D-galactopiranosiloxi-2-(octadeca-9Z, 12Z, 15Z-trienoiloxi) propanil octadeca-9Z, 12Z, 15Z-trienoato y un alto contenido de vitamina C, que puede estar comprendido en el intervalo de 0,6 a 1,5 mg por g. Se sugieren componentes adicionales tales como fosfato de ascorbilo y licopeno.

35 En la actualidad, no se sabe qué ingredientes específicos en el escaramujo proporcionan los efectos anti-inflamatorios, así como los resultados positivos en el tratamiento y el alivio del dolor en los pacientes. De esta manera, es difícil identificar las condiciones óptimas para proporcionar la composición de escaramujo, o preparar composiciones que proporcionen el efecto deseado y, como resultado, frecuentemente debe administrarse una gran dosis de las composiciones de escaramujo a un paciente con el fin de conseguir el efecto anti-inflamatorio deseado.

40 Se sugiere una cantidad de 4.500 mg del escaramujo en polvo obtenible a partir del procedimiento según el documento US 6.024.960 para proporcionar un efecto anti-inflamatorio. La administración de dicha dosis típicamente requiere la ingestión de una cantidad de píldoras, comprimidos o cápsulas, tal como 6 cápsulas al día. Sin embargo, en general, los pacientes prefieren tomar una cantidad reducida de productos farmacéuticos y nutracéuticos, haciendo de esta manera deseable reducir la cantidad de escaramujo requerida para proporcionar un efecto anti-inflamatorio.

45 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de escaramujo mejorada, estando mejorada con relación al efecto y a la concentración de ingredientes eficaces y al grado de cumplimiento del paciente.

Sumario

50 Con estos antecedentes, en un primer aspecto, un objeto de la presente descripción es proporcionar una composición que comprende escaramujo seco en polvo y vitamina C añadida, en la que el escaramujo seco en polvo es obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de proporcionar escaramujos cosechados, secar y triturar los escaramujos, separar los escaramujos triturados y aislar las cáscaras, moler las cáscaras y, opcionalmente, tamizar las cáscaras de escaramujo molidas a un tamaño de partícula inferior a 1 mm, en el que la molienda se realiza a una temperatura

sustancialmente constante, siendo dicha temperatura inferior a la temperatura ambiente, tal como inferior a 40°C, preferentemente inferior a 30°C, más preferentemente inferior a 25°C incluso más preferentemente inferior a 20°C.

5 La composición se caracteriza porque comprende una alta concentración de ingredientes activos. Los presentes inventores han identificado estos ingredientes activos como ingredientes que comprenden vitamina C, carotenos, flavonoides, ácidos triterpenoicos y galactolípidos. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, la composición obtenible mediante el procedimiento se caracteriza porque comprende vitamina C, carotenos, flavonoides, ácidos triterpenoicos y galactolípidos. Puede hacerse referencia también a dichos ingredientes activos de la composición por el nombre comercial ROSENOIDS® y/o complejo ROSENOIDS®. En su sentido más amplio, la composición se caracteriza porque tiene un efecto anti-artrítico que tiene el doble de efecto que los productos de la técnica anterior, tal como puede observarse a partir del ejemplo 2. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la composición se usa en un procedimiento para el mantenimiento de la flexibilidad de las articulaciones y la disminución de la inflamación. Los presentes inventores atribuyen el efecto anti-artrítico mejorado a las altas concentraciones de los ingredientes activos obtenibles mediante el procedimiento según la presente invención.

15 Además, la composición tiene una vida útil mejorada, lo que significa que el efecto es menos susceptible a la degradación que el de la técnica anterior.

20 Los presentes inventores han encontrado además que la composición según la invención contiene una cantidad reducida de triacilgliceroles (TAGs) y sus fragmentos, en comparación con las composiciones de escaramujo obtenidas mediante procedimientos convencionales. La cantidad reducida de TAGs puede atribuirse al aislamiento de las cáscaras, ya que se cree que contienen una cantidad reducida de TAGs en comparación con otras partes de los escaramujos, es decir, las semillas y la pulpa. Los TAGs pueden estar relacionados con la aterosclerosis y, por extensión, con el riesgo de enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular.

25 Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, en la actualidad se cree que el procedimiento crítico para la conservación de los ingredientes activos no es el procedimiento de secado, tal como se creía en los procedimientos de la técnica anterior, sino más bien la separación de las cáscaras con relación a los otros constituyentes y su molido a temperaturas frías. Se encontró que el procedimiento de molienda desarrolla calor y debido a que la molienda proporciona células abiertas de las cáscaras de escaramujo, los ingredientes activos dentro de las células son más susceptibles a la degradación que durante el procedimiento de secado.

30 Los estudios clínicos realizados con la composición según la presente invención han demostrado que dicha composición proporciona un efecto beneficioso en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, en particular en el tratamiento de la osteoartritis. La composición es al menos tan buena como una composición equivalente que comprende escaramujos secos proporcionados mediante un procesamiento convencional. En particular, los estudios han demostrado que la composición según la presente invención es al menos tan buena como una composición equivalente que comprende escaramujos secos proporcionados mediante un procesamiento convencional, incluso a dosis bajas, siendo dicha dosis la mitad de la de la técnica anterior.

35 Se cree que la composición de escaramujo seco obtenible mediante el procedimiento explica los mayores efectos inflamatorios observados por un aumento de la concentración de los ingredientes activos. Por consiguiente, un sujeto en necesidad del tratamiento o el tratamiento preventivo puede ingerir una dosis más pequeña con el fin de obtener el mismo efecto de tratamiento. Con la composición, la dosis de administración requerida para obtener un efecto anti-inflamatorio en un paciente es de 2.250 mg. Por consiguiente, sólo se requieren 3 cápsulas estándar cada día con el fin de obtener un efecto inflamatorio. De esta manera, puede aumentarse el cumplimiento del paciente.

40 La composición comprende además vitamina C añadida. Los escaramujos tienen un contenido particularmente altos de vitamina C, por lo que el contenido total de vitamina C puede ser en parte debido a las propias cáscaras de escaramujo. Sin embargo, se añade una cantidad adicional de vitamina C a la composición. Se cree que la presencia de vitamina C facilita la absorción en un sujeto de los ingredientes activos del complejo de escaramujo.

45 En una realización preferente, la vitamina C es una vitamina sintética, ya que vitamina C natural en el escaramujo ha mostrado que se degrada demasiado rápido. Se ha encontrado que la vitamina C añadida mejora la estabilidad de la composición, además de la estabilidad proporcionada por la vitamina C natural del escaramujo en polvo.

50 La cantidad de vitamina C puede añadirse en una cantidad desde aproximadamente 30 mg de vitamina C/g de escaramujo en polvo añadida a aproximadamente 80 mg de vitamina C/g de escaramujo en polvo añadida. En una realización preferente, la vitamina C se añade a una cantidad de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 2.250 mg escaramujo en polvo. La vitamina C puede ser una vitamina C sintética. Se cree además que la vitamina C adicional permite una mejor estabilidad de la composición, mejorando de esta manera la vida útil del producto.

En una realización preferente, la composición se obtiene a partir de escaramujo. Sin embargo, los presentes inventores prevén que las concentraciones específicas de los ingredientes activos individuales de la composición pueden

proporcionarse también por medios alternativos, tales como la adición y/o el suplemento de los ingredientes activos individuales.

5 La expresión alta concentración de ingredientes activos quiere decir que la composición comprende vitamina C en una cantidad de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 11,2 g/kg, carotenos en una cantidad de aproximadamente 150 a aproximadamente 560 mg/kg, flavonoides en una cantidad de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.300 mg/kg, ácidos triterpenoicos en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000 mg/kg, y galactolípidos en una cantidad de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg/kg. La alta cantidad de ingredientes activos puede obtenerse según el procedimiento de la presente invención.

10 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de una composición de escaramujo que comprende las etapas de (a) proporcionar escaramujo cosechado, (b) secar y triturar el escaramujo, (c) separar el escaramujo triturado y aislar las cáscaras, (d) moler las cáscaras, y (e) opcionalmente, tamizar las cáscaras de escaramujo molidas a un tamaño de partícula inferior a 1 mm, en el que el molido se realiza a una temperatura constante, siendo la temperatura inferior a la temperatura ambiente, tal como inferior a 40°C, preferentemente inferior a 30°C, más preferentemente inferior a 25°C incluso más preferentemente inferior a 20°C.

15 Típicamente, la etapa de molido produce calor debido a la fricción y el calor causa un aumento de la temperatura de las cáscaras sometidas a molido. De esta manera, los componentes de los escaramujos son sometidos al aumento de temperatura, lo cual se cree que resulta en la degradación de los constituyentes activos del complejo de escaramujo. Por lo tanto, la etapa del procedimiento de moler las cáscaras debe realizarse de una manera cuidadosa con el fin de no aumentar la temperatura por encima de esta temperatura máxima.

20 Los presentes inventores han desarrollado configuraciones y parámetros específicos para que un molino de molienda cumpla con estas condiciones. De esta manera, el molido se realiza a una temperatura constante, siendo dicha temperatura inferior a la temperatura ambiente de manera que los ingredientes activos del complejo no se destruyan, por ejemplo, por desnaturalización. La temperatura ambiente puede ser de 40°C, 30°C, 29°C, 28°C, 27°C, 26°C, 25°C, 24°C, 23°C, 22°C, 21°C o 20°C. En una realización preferente de la presente invención, la temperatura es inferior a 28°C, más preferentemente inferior a 25°C, más preferentemente inferior a 23°C, y aún más preferentemente inferior a 20°C. En otra realización, la temperatura está comprendida en el intervalo de 10-40°C, tal como 12-28°C, 14-26°C, 15-25°C, 15-23°C, 15-22°C, 16-21°C, 18-20°C o 19-20°C. En una realización particular, se aplica refrigeración durante la etapa de molido con el fin de mantener la temperatura sustancialmente constante inferior a la temperatura ambiente. En una realización preferente, la refrigeración aplicada es la refrigeración con aire.

30 Los presentes inventores han mostrado que el escaramujo en polvo obtenido según el procedimiento comprende la alta concentración de los ingredientes activos definida para la composición en el primer aspecto de la presente invención. Los presentes inventores han analizado el contenido del escaramujo en polvo mediante formación de perfiles metabolómicos y encontraron que el escaramujo en polvo obtenido a partir de las cáscaras de escaramujo, molidas a una temperatura constante, siendo dicha temperatura inferior a la temperatura ambiente, comprende una concentración más alta de ingredientes activos, es decir, vitamina C, carotenos, flavonoides, ácidos triterpenoicos y galactolípidos, en comparación con el escaramujo en polvo obtenido por medios convencionales.

40 Debido a que el escaramujo es un producto natural, la composición resultante del escaramujo seco puede variar de manera correspondiente. Los presentes inventores han encontrado que la composición obtenible mediante el procedimiento puede comprender además trazas o restos de tocoferoles y ácido α -linolénico, tal como prácticamente ninguna cantidad de tocoferoles y ácido α -linolénico. Los presentes inventores han demostrado que la composición según la invención que comprende vitamina C, carotenos, flavonoides, ácidos triterpenoicos y galactolípidos, y entre trazas y prácticamente ninguna cantidad de tocoferoles y ácido α -linolénico proporciona mayores efectos anti-inflamatorios. Por consiguiente, la composición obtenible que comprende vitamina C, carotenos, flavonoides, ácidos triterpenoicos y galactolípidos mediante el procedimiento ha demostrado ser eficaz para el mantenimiento de la flexibilidad de las articulaciones y la disminución de la inflamación. Puede obtenerse todavía un efecto adicional si se añaden tocoferoles y ácido α -linolénico a la composición; dicho efecto adicional puede estar dirigido a la inflamación reducida indicada anteriormente. Dicho efecto adicional puede estar relacionado también con otras propiedades beneficiosas proporcionadas por los tocoferoles y el ácido α -linolénico. En una realización de la presente invención, las cantidades naturales de tocoferoles y α -linolénico resultantes del procedimiento se mantienen.

45 Los presentes inventores encontraron que las concentraciones anteriores de los ingredientes activos pueden proporcionarse usando las cáscaras de los escaramujos. Más preferentemente moliendo las cáscaras de los escaramujos a una temperatura constante inferior a la temperatura ambiente, más preferentemente inferior a 25°C, incluso más preferentemente inferior a 20°C.

55 En todavía otra realización, el procedimiento comprende además la etapa de mezclar el escaramujo molido con vitamina C para proporcionar una composición de escaramujo en polvo y vitamina C.

Tanto las composiciones como el escaramujo en polvo obtenidos a partir de cualquiera de los dos primeros aspectos son en otro aspecto para su uso como un medicamento y/o nutracéutico.

5 Además, las composiciones y los escaramujos en polvo son para su uso en un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias o los polvos de escaramujo pueden usarse en un procedimiento para el mantenimiento de la flexibilidad de las articulaciones y la disminución de la inflamación. Dichas composiciones y polvo de escaramujo pueden ser también para su uso en un procedimiento de tratamiento de la artritis, más preferentemente artritis degenerativa.

10 Se proporciona también el uso de cualquiera de las composiciones y el escaramujo en polvo para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias, en particular artritis y más específicamente artritis degenerativa. Otra realización se refiere al uso de cualquiera de las composiciones y el escaramujo en polvo para la fabricación de un medicamento y/o nutracéutico para su uso en un procedimiento para el mantenimiento de la flexibilidad de las articulaciones y la disminución de la inflamación.

15 En otro aspecto, se proporciona un complejo que comprende al menos vitamina C, carotenos, tocoferoles, flavonoides, ácidos triterpenoicos, ácido α -linolénico y galactolípidos. Los presentes inventores han encontrado que una combinación de estos componentes ha demostrado que, cuando fueron tratados con el complejo que comprende los constituyentes individuales, los pacientes que padecían osteoartritis mostraron un alivio significativo del dolor.

20 En una realización preferente, el complejo comprende al menos vitamina C en una cantidad de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 11,2 g/kg, carotenos en una cantidad de aproximadamente 150 a aproximadamente 560 mg/kg, tocoferoles en una cantidad de aproximadamente 120 a aproximadamente 250 mg/kg, flavonoides en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.300 mg/kg, ácidos triterpenoicos en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.060 mg/kg, ácido α -linolénico en una cantidad de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 2,2 g/kg, y galactolípidos en una cantidad de aproximadamente 85 a aproximadamente 1.030 mg/kg.

25 Cuando están presentes en estos intervalos, se cree que el efecto anti-inflamatorio es eficaz de manera que la dosis diaria puede reducirse a la mitad sin afectar al efecto anti-inflamatorio. De esta manera, se encontró que con los intervalos proporcionados anteriormente, una mayor administración del complejo no resultó en un mayor efecto anti-inflamatorio.

30 En una realización, el complejo es para su uso como un medicamento y/o nutracéutico y, en una realización preferente, el complejo es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias. De esta manera, la presente descripción se refiere también al uso del complejo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias. En otra realización preferente, la enfermedad inflamatoria es artritis, artritis degenerativa más preferentemente artritis degenerativa.

En una realización preferente, el complejo se obtiene a partir de escaramujo e incluso más preferentemente a partir de escaramujo según cualquiera de los aspectos de la invención.

35 De esta manera, pueden proporcionarse concentraciones específicas de los constituyentes individuales del complejo mediante el uso del procedimiento según la presente invención o mediante medios alternativos tales como la adición de los constituyentes individuales. En particular, a la composición obtenible mediante el procedimiento según la presente invención pueden añadirse cantidades adicionales de los constituyentes individuales, tales como tocoferoles y/o ácido α -linolénico.

Figuras

40 La Figura 1 muestra los resultados de un estudio in vitro de los efectos de dos composiciones de escaramujo (RH-H y RH-P) sobre la secreción de proteínas de CCL5/RANTES por los leucocitos de sangre periférica (PBL) en una respuesta inflamatoria inducida. La secreción de proteínas se presenta para PBL incubados durante 24 horas a las condiciones indicadas: no estimulada (ninguna); activada con endotoxina (lipopolisacárido, LPS) e IFN- γ para inducir una respuesta inflamatoria (LPS/IFN γ); activada con LPS/IFN γ en presencia de 125 mg/l (bajo, columna de la izquierda), 250 mg/l (medio, columna central) y 500 mg/l (alto, columna de la derecha) de RH-H o RH-P, respectivamente.

45 La Figura 2 muestra los resultados de un estudio in vitro de los efectos de dos composiciones de escaramujo (RH-H y RH-P) sobre la secreción de proteínas de CXCL10/IP-10 por PBLs en una respuesta inflamatoria inducida. La secreción de proteínas se presenta para PBL incubados durante 24 horas a las condiciones indicadas: no estimulada (ninguna); activada con LPS/IFN- γ (LPS/IFN γ); activada con LPS/IFN γ en presencia de 125 mg/l (bajo, columna de la izquierda), 250 mg/l (medio, columna central) y 500 mg/l (alto, columna de la derecha) de RH-H o RH-P, respectivamente.

50 La Figura 3 muestra los resultados de un estudio in vitro de los efectos de dos composiciones de escaramujo (RH-H y RH-P) sobre la expresión génica de CXCL10/IP-10 por PBL en una respuesta inflamatoria inducida. La secreción de proteína se presenta para PBL incubados durante 12 horas en las condiciones indicadas: no estimulada (ninguna); activada con

LPS/IFN- γ para inducir una respuesta inflamatoria (LPS/IFN γ); activada con LPS/IFN γ en presencia de 125 mg/l (bajo, columna de la izquierda), 250 mg/l (medio, columna central) y 500 mg/l (alto, columna de la derecha) de RH-H o RH-P, respectivamente. La expresión génica relativa se expresa como factor de cambio (versus células no estimuladas, fijado arbitrariamente en 1).

- 5 La Figura 4 muestra una comparación de diferentes preparaciones y dosis de escaramujo en polvo en pacientes con osteoartritis de la rodilla tal como se detalla en el ejemplo 2. Se encuentra que estas cantidades de los constituyentes individuales del complejo de escaramujo superan las concentraciones medias contenidas en los escaramujos. Por lo tanto, se sugiere que el complejo indicado anteriormente que tiene los componentes individuales en estas concentraciones proporciona una mayor potencia con respecto a las propiedades anti-inflamatorias.
- 10 La Figura 5 muestra espectros DART-TOFMS de muestras individuales, proporcionando de esta manera una comparación de perfiles metabolómicos para extractos de MeOH/H₂O extractos a partir de cuatro muestras diferentes de escaramujo en polvo derivadas de Rosa canina, Rosa moschata y Rosa rubiginosa (modo de ion positivo, 250°C). Las muestras A y C se preparan mediante procedimientos convencionales, mientras que las muestras B y D se obtienen mediante el procedimiento según la presente invención.
- 15 La Figura 6 muestra espectros DART-TOFMS de las muestras A a D para una comparación de los perfiles metabolómicos de los extractos de acetato de etilo de las muestras (modo de ion positivo, 250°C).
- La Figura 7 muestra espectros DART-TOFMS de las muestras A a D para una comparación de los perfiles metabolómicos de los extractos de hexano de las muestras (modo de ion positivo, 250°C).
- 20 La Figura 8 muestra espectros DART-TOFMS de las muestras A a D para una comparación de los perfiles metabolómicos de los extractos de MeOH/H₂O de las muestras (modo de ion negativo, 250°C).
- La Figura 9 muestra espectros DART-TOFMS de las muestras A a D para una comparación de los perfiles metabolómicos de los extractos de acetato de etilo de las muestras (modo de ion negativo, 250°C).
- La Figura 10 muestra espectros DART-TOFMS de las muestras A a D para una comparación de los perfiles metabolómicos de los extractos de hexano de las muestras (modo de ion negativo, 250°C).
- 25 La Figura 11 muestra una comparación gráfica del contenido de flavonoides en las muestras A a D de escaramujo en polvo. Los flavonoides se determinaron usando cromatografía líquida de rendimiento ultra-elevado junto con espectrómetro de masas en tándem. Los resultados se resumen también en la Tabla 7.

Descripción detallada de la invención

- 30 A continuación, la presente invención se describe más detalladamente. Todas las características y detalles pueden aplicarse igualmente a cualquiera de entre la composición, el complejo y el procedimiento.

El primer aspecto de la presente descripción se refiere a una composición que comprende escaramujo seco y vitamina C, en el que el escaramujo seco es obtenible mediante un procedimiento que comprende las etapas de proporcionar escaramujos cosechados, secar y triturar los escaramujos, separar los escaramujos triturados rosa y aislar las cáscaras, moler las cáscaras y, opcionalmente, tamizar el escaramujo molido a un tamaño de partícula inferior a 1 mm, en el que el molido se realiza a una temperatura constante, siendo la temperatura inferior a la temperatura ambiente, tal como 40°C.

35

Los escaramujos pueden obtenerse a partir de cualquiera de las especies de plantas pertenecientes a la familia de la rosa. Debido a que el escaramujo es un producto natural, la composición de escaramujo seco puede variar en consecuencia. El procedimiento para obtener el escaramujo seco no debería interpretarse como limitativo del alcance de la invención. El escaramujo seco puede obtenerse mediante cualquier forma de procesamiento alternativa. Sin embargo, el escaramujo seco del primer aspecto de la invención muestra un mayor efecto que los productos de la técnica anterior debido a que los ingredientes activos de escaramujo están presentes en una mayor concentración en comparación con el escaramujo seco convencional. En particular, el escaramujo seco obtenible mediante dicho procedimiento contiene una mayor cantidad de ingredientes activos denotados como ROSENOIDS® y/o complejo ROSENOIDS®, que se cree que comprenden principios activos de escaramujos para el tratamiento y la prevención de una diversidad de afecciones, tales como enfermedades inflamatorias.

40

45

El término escaramujo hace referencia al fruto de la planta de la rosa. Los escaramujos pueden obtenerse a partir de cualquiera de las especies de plantas pertenecientes a la familia de la Rosa, tales como Rosa canina, Rosa mochata, Rosa rubiginosa, Rosa gallica, Rosa conditata, Rosa rugosa, Rosa hugonis, Rosa nitida, Rosa pendulina, Rosa pimpinellifolia y Rosa sericea, así como cualquier mezcla de las mismas. Sin embargo, la presente invención no debería limitarse a estos escaramujos o a escaramujos de cualquier especie particular de plantas de rosa.

50

El escaramujo es un producto natural y, por lo tanto, varios factores ambientales influyen en el resultado de los cultivos.

Dichas variaciones pueden ser debidas a, pero sin limitarse a, las condiciones nutricionales del suelo entre diferentes campos, las condiciones climáticas durante la temporada de cultivo, tales como la temperatura media y las precipitaciones, las plagas, la cosecha y otras influencias ambientales, tales como la fertilización. Por lo tanto, la composición del escaramujo seco puede variar en consecuencia. El contenido del escaramujo seco puede variar también entre las especies de escaramujo. Típicamente, el fruto de la planta de la rosa es de color rojo-naranja-a y consiste en una cáscara que incluye racimos de semillas rodeados de pulpa de fruto.

La provisión del escaramujo el cosechado implica que los escaramujos se cosechan cuando la fruta está madura o completamente madura. El procedimiento de cosechado es de conocimiento general común para la persona con conocimientos en la materia. Las etapas adicionales de secado y de triturado de los escaramujos, así como de separación y aislamiento de las cáscaras pueden realizarse también usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, tal como se describe en el documento US 6024960 en el que el secado se realiza a una temperatura inferior a 50°C usando aire y evitando la luz solar. Sin embargo, el secado no está limitado a este procedimiento. Puede usarse cualquier técnica adecuada de secado.

Después del secado, los escaramujos se pican. Después del triturado, el escaramujo se separa de diversos materiales extraños.

El triturado y la separación pueden realizarse en cualquier medio adecuado que es bien conocido en la técnica.

Además, los inventores han encontrado que se obtiene una composición mejorada cuando sólo se usan las cáscaras de los escaramujos secos. En una realización preferente, los escaramujos secos consisten sustancialmente en las cáscaras de los escaramujos. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna específica, se cree que las cáscaras comprenden una mayor cantidad de los ingredientes activos, es decir, vitamina C, carotenos, flavonoides, ácidos triterpenoicos y galactolípidos, en comparación con los otros constituyentes del escaramujo, por ejemplo las semillas y la pulpa. Por lo tanto, la provisión de la composición con las cáscaras procesadas aumenta la concentración de los ingredientes activos en la composición. Con el fin de mantener el máximo de actividad de los ingredientes activos de los escaramujos secos, la temperatura de los escaramujos no debería exceder la temperatura ambiente durante el procesamiento. Se ha encontrado que los ingredientes activos son más vulnerables durante la molienda en comparación con el secado. De esta manera, en la etapa del procedimiento de secado los escaramujos cosechados pueden exceder las temperaturas de la etapa de molido, y deberían cumplir preferentemente pero no necesariamente con el requisito descrito en la técnica anterior.

En una realización, la composición comprende escaramujo seco y vitamina C, en el que el escaramujo seco se obtiene mediante el procedimiento según otro aspecto de la invención. En este aspecto de la presente invención, el procedimiento de fabricación de escaramujo seco comprende las etapas de (a) proporcionar escaramujos cosechados, (b) secar y triturar los escaramujos, (c) separar los escaramujos triturados y aislar las cáscaras, (d) moler las cáscaras, y opcionalmente (e) tamizar el escaramujo molido a un tamaño de partícula inferior a un tamaño de partícula adecuado, tal como inferior a 1 mm, en el que el molido se realiza a una temperatura constante, siendo la temperatura inferior a la temperatura ambiente, tal como inferior a 40°C, preferentemente inferior a 30°C, más preferentemente inferior a 25°C e incluso más preferentemente inferior a 20°C. Por consiguiente, en una realización, la temperatura es inferior a 40°C.

Inicialmente, se proporcionan los escaramujos cosechados, lo que implica que los escaramujos se cosechan cuando la fruta se madura o completamente madura, asegurando de esta manera que los ingredientes activos están presentes. El procedimiento de cosechado es de conocimiento general común para la persona con conocimientos en la materia y puede realizarse de manera manual o mediante el uso de cualquier equipo adecuado para este propósito. A continuación, los escaramujos se secan y se pican. Estas etapas pueden realizarse en cualquier orden adecuado. La etapa de secado puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo secado con aire y/o secado al sol. El secado de los escaramujos se realiza bajo una temperatura controlada y estandarizada conservando de esta manera los ingredientes activos de los escaramujos y a un contenido de agua estandarizado. Los escaramujos se pican en trozos más pequeños. Puede usarse cualquier procedimiento adecuado para triturar los escaramujos. A continuación, los escaramujos triturados se separan de manera que se aislen las cáscaras. Las cáscaras pueden denominarse también pieles. La pulpa del fruto, las semillas, los pelos finos que se encuentran en el interior de los escaramujos, etc., se descartan. La separación puede llevarse a cabo usando cualquier técnica adecuada. A continuación, las cáscaras aisladas se muelen en un molino de molienda.

Los presentes inventores han encontrado que es esencial que la molienda de las cáscaras de escaramujo se lleve a cabo a una temperatura inferior a la temperatura ambiente con el fin de conservar los ingredientes activos. Los presentes inventores han encontrado además que puede requerirse un molino específico con el fin de cumplir con este requisito. En una etapa final, las cáscaras de escaramujo molidas se tamizan con el fin de obtener un tamaño de partícula inferior a 1 mm.

El tamaño de partícula puede asegurarse mediante medios convencionales, tales como tamizado. Puede aplicarse cualquier procedimiento adecuado para tamizar las partículas. Preferentemente, las partículas de escaramujo molido no

exceden el tamaño de 1 mm. El molido del escaramujo a dicho tamaño de partícula proporciona una forma adecuada de la composición para la administración. El tamaño de partícula más pequeño asegura adicionalmente un mezclado eficiente del escaramujo con la vitamina C. En una realización, el tamaño de partícula es inferior a 800 micrómetros, preferentemente inferior a 700 micrómetros, más preferentemente inferior a 600 micrómetros y aún más preferentemente inferior a 550 micrómetros.

El procedimiento puede comprender etapas adicionales, que serán conocidas por una persona con conocimientos en la materia. Dichas etapas pueden incluir la limpieza de los escaramujos para extraer cuerpos extraños, la inspección visual, el control y la selección, el envasado, el almacenamiento, el transporte, la encapsulación, etc. En una realización, el procedimiento comprende una etapa adicional (f), en la que las partículas más grandes que el tamaño de partícula requerido se reciclan al molino de molienda con el fin de mejorar la producción global. En otra realización, se aplica una etapa adicional de separación (g) en la que las partículas molidas inferiores a un tamaño específico se clasifican. El límite umbral mínimo para el tamaño de partícula puede ser de 0 micrómetros. De esta manera, el tamaño de partícula del complejo de escaramujo final pasa a ser entonces de aproximadamente 0 micrómetros a aproximadamente 1 mm, tal como en el intervalo de aproximadamente 150 a aproximadamente 800 micrómetros, o de 200 a aproximadamente 700 micrómetros, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 700 micrómetros, o de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 micrómetros, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 600 micrómetros, tal como 550 micrómetros. Se encuentra que dicho tamaño de partícula es especialmente adecuado para cápsulas.

Las partículas por debajo del límite umbral mínimo todavía pueden usarse para otros propósitos, por ejemplo, para un producto en polvo. Un tamizado y un reciclaje proporcionan una distribución uniforme del tamaño de las partículas del producto. El procedimiento puede comprender una etapa adicional (h) de mezclar el escaramujo seco con vitamina C. Los presentes inventores han estudiado con gran detalle la composición indicada anteriormente y han identificado los ingredientes activos del escaramujo en polvo, que se cree que explican los efectos beneficiosos proporcionados por el escaramujo seco. Sin embargo, la presente invención no debería quedar ligado a teoría alguna específica para explicar los efectos bioquímicos y fisiológicos de la composición sobre el cuerpo humano o animal.

En una realización, la composición obtenible según el procedimiento de la invención comprende vitamina C, carotenos, flavonoides, ácidos triterpenoicos y galactolípidos. En una realización más preferente, la composición se caracteriza además porque la vitamina C está presente en una cantidad de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 11,2 g/kg, los carotenos están presentes en una cantidad de aproximadamente 150 a aproximadamente 560 mg/kg, los flavonoides están presentes en una cantidad de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.300 mg/kg, los ácidos triterpenoicos están presentes en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000 mg/kg, y los galactolípidos están presentes en una cantidad de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg/kg.

En otra realización, la composición se caracteriza además porque los tocoferoles están presentes en una cantidad de menos de 120 mg/kg, tal como menos de 110 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 10 mg/kg o 1 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mg/kg, y el ácido α -linolénico está presente en una cantidad de menos de 0,15 g/kg, tal como menos de 0,10 g/kg, 0,01 g/kg, 0,001 g/kg, 0,0001 g/kg, o 0,00001 g/kg, tal como de aproximadamente 0,000001 a aproximadamente 0,00001 g/kg. De esto se deduce que en una realización preferente la composición se obtiene según el procedimiento de la presente invención, es decir, la composición se deriva a partir de cáscaras de escaramujo. Debido a que el escaramujo es un producto natural, la composición resultante del escaramujo seco puede variar en consecuencia. En particular, los presentes inventores han descubierto que la composición obtenible mediante el procedimiento puede comprender sólo pequeños restos de tocoferoles y ácido α -linolénico. Los tocoferoles y el ácido α -linolénico pueden añadirse a la composición, sin embargo, en una realización de la presente invención, las cantidades naturales de tocoferoles y α -linolénico resultantes del procedimiento se mantienen. En otra realización, se añaden tocoferoles y ácido α -linolénico a la composición.

Otro aspecto se refiere a un complejo que comprende al menos carotenos, tocoferoles, flavonoides, ácidos triterpenoicos, ácido α -linolénico y galactolípidos y, en una realización preferente, el complejo comprende al menos vitamina C en una cantidad de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 11,2 g/kg, carotenos en una cantidad de aproximadamente 150 hasta aproximadamente 560 mg/kg, tocoferoles en una cantidad de aproximadamente 120 a aproximadamente 250 mg/kg, flavonoides en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.300 mg/kg, ácidos triterpenoicos en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.060 mg/kg, ácido α -linolénico en una cantidad de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 2,2 g/kg, y galactolípidos en una cantidad de aproximadamente 85 a aproximadamente 1.030 mg/kg.

En otra realización, el complejo comprende vitamina C en una cantidad superior a 5 g/kg, tal como por ejemplo 6 g/kg, preferentemente en una cantidad superior a 7 g/kg, más preferentemente superior a 8 g/kg, tal como por ejemplo 9 g/kg, y todavía más preferentemente superior a 10 g/kg. En otra realización, el complejo comprende carotenos en una cantidad superior a 200 mg/kg, preferentemente en una cantidad superior a 300 mg/kg, más preferentemente superior a 400 mg/kg, e incluso más preferentemente superior a 500 mg/kg. En todavía otra realización, el complejo comprende tocoferoles en una cantidad superior a 150 mg/kg, preferentemente en una cantidad superior a 180 mg/kg, más

preferentemente superior a 200 mg/kg, y todavía más preferentemente superior a 230 mg/kg. En otra realización, el complejo comprende flavonoides en una cantidad superior a 600 mg/kg, tal como 700 mg/kg, preferentemente en una cantidad superior a 800 mg/kg, más preferentemente superior a 900 mg/kg, y todavía más preferentemente superior a 1.000 mg/kg. Ácidos triterpenoicos en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.060 mg/kg. En otra realización, la cantidad de ácidos triterpenoicos es superior a 500 mg/kg, tal como superior a 600 mg/kg o superior a 700 mg/kg, preferentemente en una cantidad superior a 800 mg/kg, más preferentemente superior a 900 mg/kg. En todavía otra realización, el complejo comprende α -linolénico en una cantidad superior a 0,5 g/kg, preferentemente en una cantidad superior a 1,0 g/kg, más preferentemente superior a 1,5 g/kg, y todavía más preferentemente superior a 2,0 g/kg. En otra realización, el complejo comprende galactolípidos en una cantidad superior a 100 mg/kg, 200 mg/kg o 300 mg/kg, tal como superior a 400 mg/kg, preferentemente en una cantidad superior a 500 mg/kg, más preferentemente superior a 600 mg/kg, tal como 700 mg/kg, incluso más preferentemente superior a 800 mg/kg, tal como 900 mg/kg, y todavía más preferentemente superior a 1.000 mg/kg.

Típicamente, los carotenos se indican con la fórmula química $C_{40}H_{56}$ y pertenecen a la familia de los carotenoides. Son compuestos orgánicos, que se dan como pigmentos entre naranja-amarillos y rojos en muchas plantas y en tejido animal, por ejemplo, como β -caroteno en las zanahorias. Los carotenos pueden encontrarse en diversas formas isoméricas y las cadenas hidrocarbonadas pueden ser saturadas o insaturadas. El licopeno es un caroteno que se encuentra típicamente en frutas y verduras. Los tocoferoles del complejo son un grupo de alcoholes solubles en grasa, estrechamente relacionados, que constituyen la vitamina E y compuestos similares, tales como α -tocoferol y γ -tocoferol. Los flavonoides son cualquiera de entre una gran clase de pigmentos vegetales. Los flavonoides en los escaramujos incluyen rutina, catequina y quercetina y se indican típicamente con la fórmula química $C_{15}H_{14}O_6$. Los ácidos triterpenoicos se derivan a partir de moléculas de triterpeno e incluyen ácido betulínico, oleanólico y ácidos ursólicos. Los ácidos triterpenoicos se indican típicamente con la fórmula química $C_{30}H_{48}O_3$. El ácido α -linolénico es un ácido graso carboxílico común y se indica típicamente con la fórmula química $C_{18}H_{30}O_2$. Los galactolípidos pueden ser cualquier galactolípidos o mezcla adecuada de los mismos, tal como octadeca-9Z, 12Z, 15Z-trienoato de 3-beta-D-galactopiranosiloxi-2-(octadeca-9Z, 12Z, 15Z-trienoiloxi)propanilo. Sin embargo, la presente invención no se limita a un complejo que consiste solamente en estos constituyentes. El complejo es obtenible al menos mediante el procedimiento según la presente invención y se cree que es el ingrediente activo en los escaramujos para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias. Se prevé que el complejo pueda ser proporcionado a partir de otras fuentes, tales como aislando y mezclando entre sí los constituyentes individuales.

Mediante la identificación de los ingredientes activos indicados anteriormente, los presentes inventores han proporcionado los medios para optimizar las formulaciones nutracéuticas y farmacéuticas. En particular, los presentes inventores han encontrado que un alto contenido de los ingredientes activos se encuentra en las cáscaras de los escaramujos y, más particularmente, se conservan cuando se preparan según el nuevo procedimiento de la invención.

En una realización, la composición de escaramujo es para su uso como un medicamento. El término "medicamento" significa que la composición se usa para tratar y/o inhibir y/o prevenir y/o aliviar los síntomas de una enfermedad y/o una afección. La composición puede ser clasificada como un suplemento farmacéutico o nutracéutico o dietético. La composición puede formularse para cualquier forma de administración adecuada a un sujeto.

En una realización preferente, la composición se prepara para la administración oral. La forma en que se prepara la composición puede ser cualquier forma adecuada para la administración oral, tal como un líquido, un gel, un polvo, un comprimido o una cápsula. En una realización preferente, la composición está en forma de un polvo seco encapsulado en una cápsula de cáscara dura. En otra realización, puede administrarse también como un polvo solubilizado en agua.

Los términos "convencional", "original" u "ordinario" junto con escaramujo en polvo/composiciones pueden usarse indistintamente y se refieren a productos obtenidos mediante procedimientos conocidos anteriormente, tales como los procedimientos descritos en los documentos US 6.024.960 y WO 2008/006589. El escaramujo en polvo preparado a partir de, por ejemplo, pulpa seca del fruto de escaramujo y/o preparado moliendo el escaramujo a una temperatura por encima de los límites de temperatura según la presente invención.

En particular, se entiende que la expresión escaramujo en polvo convencional u original hace referencia a productos que no comprenden la composición y los ingredientes activos según la presente invención en las concentraciones descritas en la presente memoria y los efectos documentados en la presente memoria.

En una realización preferente, la composición de escaramujo es para su uso en un procedimiento para el mantenimiento de articulaciones flexibles, sanas, la movilidad de las articulaciones y la disminución de la inflamación. En dicha realización, la composición podría ser clasificada como un nutracéutico natural y/o como un suplemento dietético. En otra realización, la composición de escaramujo es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias. De esta manera, la presente descripción se refiere también al uso de la composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias. Se entiende que la expresión "enfermedad inflamatoria" incluye cualquier enfermedad, trastorno y/o afección que se caracteriza por un estado de

inflamación en el cuerpo de un ser humano o animal, tal como inflamación aguda o crónica resultante de una producción excesiva de mediadores inflamatorios. En una realización, la enfermedad inflamatoria es artritis. La artritis es un grupo de afecciones que implican daño a las articulaciones del cuerpo. La forma más común de artritis, osteoartritis, es el resultado de un traumatismo en la articulación, una infección de la articulación o la edad. En una realización, la artritis es artritis degenerativa. Los términos "artritis degenerativa", "osteoartritis" y "enfermedad degenerativa de las articulaciones" pueden utilizarse indistintamente y se refieren a un síndrome clínico en el que una inflamación de bajo grado resulta en dolor en las articulaciones, causado por un desgaste anormal del cartílago que cubre y actúa como una almohadilla en el interior de las articulaciones y la destrucción o la disminución del líquido sinovial que lubrica las articulaciones. A medida que se degrada la protección de las superficies de los huesos por el cartílago, el paciente experimenta dolor después de cargar peso, caminar y permanecer de pie. Debido al menor movimiento a causa del dolor, los músculos regionales pueden atrofiarse y los ligamentos pueden volverse más laxos. En otra realización, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad reumática. Las enfermedades reumáticas abarcan un grupo de enfermedades que afectan a los tejidos musculoesqueléticos y conectivos del cuerpo. Estas enfermedades se caracterizan por una inflamación crónica que conduce frecuentemente a un daño tisular permanente, deformidad, atrofia y discapacidad. Las enfermedades reumáticas afectan a las articulaciones, los huesos, los tejidos blandos o la médula espinal y se clasifican como reumatismo inflamatorio, reumatismo degenerativo, reumatismo extra-articular o enfermedades del colágeno. Se conoce que algunas enfermedades reumáticas son enfermedades autoinmunes causadas por una respuesta inmunitaria alterada de un sujeto. En una realización particular de la presente invención, la enfermedad reumática es artritis reumatoide. La artritis reumatoide es una enfermedad reumática progresiva. Esta enfermedad se caracteriza por sinovitis inflamatoria persistente que causa destrucción del cartílago y erosión ósea, lo que conduce a deformidades estructurales en las articulaciones periféricas. Los síntomas asociados con la artritis reumatoide incluyen inflamación de las articulaciones, dolor articular, inflamación, rigidez matutina y dolor, especialmente tras la flexión.

La cantidad de ingredientes activos y constituyentes del complejo puede cuantificarse mediante creación de perfiles metabolómicos. Dichos procedimientos pueden comprender cualquier procedimiento adecuado para analizar cualitativa y/o semi-cuantitativamente la composición, tal como espectrometría de masas o cromatografía. Una persona con conocimientos en la materia reconocerá fácilmente los procedimientos necesarios.

Se entiende que la expresión "composición de escaramujo" hace referencia a una composición que comprende los ingredientes activos de escaramujo, dichos ingredientes activos pueden denominarse también un complejo ya que consiste en múltiples constituyentes, que son/han sido difíciles de identificar, comprender y/o analizar. La expresión no debería interpretarse como un compuesto químico en el que las moléculas, los grupos o los iones están unidos a un átomo central mediante enlaces coordinados. Los inventores no han encontrado evidencias de dichas relaciones químicas entre los constituyentes y en la actualidad no son conscientes de la estructura interna de la composición. Los presentes inventores han encontrado que la composición de escaramujo comprende los ingredientes activos en altas concentraciones cuando se obtiene mediante el procedimiento según la presente invención.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un producto de escaramujo en polvo obtenible mediante el procedimiento de la presente invención. En una realización, el producto de escaramujo en polvo es un nutracéutico para la administración oral, tal como un líquido, un gel, un polvo, un comprimido o una cápsula. En una realización preferente, el producto de escaramujo en polvo está en forma de un polvo seco encapsulado en una cápsula de cáscara dura. En una realización todavía más preferente, el producto de escaramujo en polvo está en forma de una bebida en polvo.

A continuación, se evalúa el efecto de las composiciones, los complejos y el escaramujo en polvo según los aspectos de la invención. Sin embargo, la invención no debería limitarse a esto.

Ejemplos

Ejemplo 1

Propiedades anti-inflamatorias de dos preparaciones de escaramujo

En este estudio, se evaluaron los efectos de dos preparaciones RH (RH-H y RH-P) sobre la producción de mediadores inflamatorios por leucocitos de sangre periférica. Las preparaciones se prepararon según la presente invención y diferían sólo en el tipo de escaramujo usado. Las preparaciones se ensayaron en leucocitos de sangre periférica (PBL), que fueron estimulados con endotoxina (lipopolisacárido, LPS) e IFN- γ para inducir una respuesta inflamatoria.

Material y procedimientos

Reactivos: Se obtuvieron dos preparaciones de RH (RH-H y RH-P). Los compuestos se disolvieron en DMSO, se sometieron a ultrasonidos y se añadieron al medio de cultivo de manera simultánea con el estímulo. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo era del 0,5%. LPS era de *E. coli* (Serotipo 055:B5; Sigma, Saint-Louis, MO, USA). RPMI 1640, 2-mercaptoetanol, MEM aminoácidos no esenciales (NEAA), solución salina tampona con fosfato (PBS) de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA); suero bovino fetal (FBS) de Sigma. Interferón- γ recombinante humano (IFN- γ) de

PeproTech EC (Londres, Reino Unido).

5 Cultivo de células: los leucocitos de sangre periférica (PBL) se aislaron de la capa leucocitaria obtenida a partir de donantes sanos en el centro de donantes de sangre local (University Hospital, Basilea, Suiza). Los eritrocitos residuales se eliminaron mediante el procedimiento de sedimentación con dextrano. Los PBL (a 8×10^6 células/ml) se cultivaron en medio RPMI 1640 libre de rojo fenol, suplementado con 0,25% de FBS, NEAA 0,1 mM, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M. Los PBL se estimularon con LPS (100 ng/ml) e IFN-γ (20 U/ml) durante 12 y 24 horas. Las células se lisaron en tampón RLT (Qiagen) después de 12 horas de cultivo y se extrajo el ARN total.

10 Análisis multiparamétrico de las quimioquinas y las interleucinas: Se obtuvieron kits multiparamétricos de BIO-RAD Laboratories (Hercules, CA, USA) y se usaron en el dispositivo LiquiChip Workstation 200 (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. En este estudio se usaron una selección de 4 citoquinas/quimiocinas (IL-1alfa, IL-1beta, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10). Los datos se adquirieron con el software Luminex IS 2.3 y se evaluaron con el software LiquiChip Analyser proporcionado por Qiagen.

Resultados y discusión

15 Efectos de las sustancias sobre la producción y la secreción de dos quimiocinas: Los leucocitos de sangre periférica (PBL) se activaron con LPS/IFN-γ y se cultivaron sin o con diferentes concentraciones de sustancias (es decir, 125 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l). Los PBL respondieron a la estimulación con LPS/IFN-γ con un marcado aumento de la producción de quimiocinas proinflamatorias (CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10) (Tabla 1 y Figura 1 y Figura 2); esto se refleja mejor en la relación de producción entre células estimuladas y no estimuladas (Tabla 1). La producción de CXCL10/IP-10 se redujo drásticamente en todas las concentraciones ensayadas. De manera similar, la producción de CCL5/RANTES se alteró de manera significativa y dependiente de la dosis. Colectivamente, RH-H y RH-P modularon fuertemente la secreción de quimiocinas. RH-H y RH-P no diferían sustancialmente en su actividad biológica, tal como se investigó mediante los dos parámetros biológicos.

25 Efectos de las sustancias sobre la expresión génica en BPL: El efecto de las sustancias se evaluó también a nivel de la expresión génica. Para este objetivo, las células se cultivaron en las condiciones apropiadas para 12 horas y se determinaron los niveles de ARNm para 4 genes de las vías inflamatorias mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los efectos observados se resumen en la Tabla 2 y la Figura 3. CXCL10/IP-10 fue inhibido drásticamente en >70% en todas las dosis ensayadas. A diferentes concentraciones de RH (125 - 500 mg/l), los efectos dependientes de la dosis de RH-H y RH-P sobre los genes modulados eran evidentes (Figura 3). Cualitativamente, RH-H y RH-P exhibieron efectos antiinflamatorios similares sobre los PBL. Esto se ilustra mejor mediante los efectos comparables sobre la reducción de quimiocinas (por ejemplo, CCL5/RANTES, CXCL10/IP-10). De particular interés es la observación de que RH parece actuar a diferentes niveles fisiológicos sobre los PBL: interfiere con CXCL10/IP-10 a nivel transcripcional, mientras reduce CCL5/RANTES sólo a nivel postranscripcional y presumiblemente actúa sobre la síntesis de proteínas.

Tabla 1

Secreción de proteínas por PBL estimulados						
Proteína	Relación estim./no estim.	LPS/IFN-γ S	LPS/IFN-γ + RH-H (500 mg/l)		LPS/IFN-γ + RH-P (500 mg/l)	
		pg/ml ± SD	pg/ml ± SD	valor p	pg/ml ± SD	valor p
CCL5/RANTES	190	2723 ± 758	1366 ± 135	0,04	833 ± 44	0,01
CXCL10/IP-10	13	12333 ± 731	161 ± 32	< 0,001	82 ± 22	< 0,001

35

Tabla 2

Efectos de las sustancias sobre la expresión génica en PBL estimulados						
Gen	LPS/IFN- γ		LPS/IFN- γ + RH-H (500 mg/l)		LPS/IFN- γ + RH-P (500 mg/l)	
	tasa de cambio	tasa de cambio	valor p	tasa de cambio	valor p	
CXCL10/IP-10	72,8	7,7	< 0,001	6,4	< 0,001	

Ejemplo 2

Comparación de diferentes preparaciones y dosis de escaramujo en polvo en pacientes con osteoartritis de rodilla: un ensayo exploratorio aleatorizado controlado activamente

Un nutracéutico que ha mostrado resultados prometedores en la reducción del dolor en pacientes con artrosis es escaramujo en polvo especializado. La dosis que ha demostrado ser eficaz en ensayos clínicos es de 6 cápsulas por día. De esta manera, es deseable aumentar la potencia de los escaramujos con el fin de mejorar el resultado clínico. El objetivo era explorar las similitudes y diferencias en el producto de escaramujo mostrado previamente como eficaz (escaramujo en polvo especializado) siendo producido dicho escaramujo según el procedimiento de la técnica anterior descrito en el documento US 6.024.960 y dos dosis diferentes de composiciones de escaramujo en polvo según la invención denominadas ROSENOIDS® en pacientes con osteoartritis de rodilla.

Este fue un ensayo exploratorio, aleatorizado, controlado activamente, de tres grupos, de 12 semanas en un único centro, ciego tanto para los pacientes como para el evaluador de los resultados, en pacientes con artrosis sintomática de rodilla. Los pacientes se estratificaron por sexo, y se asignaron aleatoriamente para recibir "escaramujo en polvo original" 4.500 mg (n = 49) grupo A, "escaramujo en polvo mejorado" 4.500 mg contenía ROSENOIDS®, es decir, la composición según la presente invención (n = 50) grupo B, o solo 2.250 mg de escaramujo en polvo que contenía ROSENOIDS®, es decir, la composición según la presente invención (n = 51) grupo C. La medida resultante primaria (después de 12 semanas) fue el cambio en el apartado "Dolor al caminar en una superficie plana" del cuestionario Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) con los apartados individuales valorados en una escala de Likert de 5 puntos de 0 a 4. Los resultados secundarios incluían las cinco sub-escalas KOOS (Funcionamiento, Calidad de vida, Dolor, Funcionamiento en el deporte y la recreación, y Síntomas).

Todos los análisis estadísticos se basan en la población con intención de tratar (Intention-To-Treat, ITT) (N = 150), sustituyendo los datos que faltan con una asignación de última observación realizada (Last-Observation-Carried-Forward, LOCF).

Al inicio del estudio, los pacientes del estudio tenían síntomas de osteoartritis de gravedad moderada ("Puntuación de síntomas" media 60,9 puntos KOOS); el "Dolor al caminar sobre una superficie plana" correspondió a una media de 1,3 puntos KOOS (0-4). Durante el período de ensayo, la tasa de desgaste fue igual en todos los grupos (el 8% para el grupo A, el 6% para el grupo B y el 8% para el grupo C, respectivamente). Para el resultado primario, el alivio del dolor era igual de bueno en todos los grupos, aunque la interacción entre el tiempo y el grupo indicó algunas diferencias con el tiempo (tiempoXgrupo, P = 0,075).

El cambio estadísticamente significativo en "Dolor al caminar" en cada grupo corresponde a una mejora media del 19% para el Grupo A, del 24% para el grupo B y del 29% para el Grupo C, respectivamente, tal como se muestra en la Figura 4.

En segundo lugar, los datos acerca de los síntomas KOOS respaldaron también el escaramujo en polvo mejorado a dosis bajas que contiene ROSENOIDS® (2.250 mg) en comparación con el "escaramujo en polvo especializado" 5,97 (CI 95%: 0,92 a 11,02) puntos KOOS (P = 0,02). Esto sugiere que la composición según la presente invención es al menos tan buena como la composición de la técnica anterior, incluso a dosis baja, como el producto de escaramujo usado previamente en los ensayos clínicos. Se sugiere que las composiciones novedosas según la invención, indicadas complejos ROSENOIDS® explican el aumento de los efectos anti-inflamatorios observados.

Ejemplo 3

Creación de perfiles metabolómicos de muestras de escaramujo en polvo y comparación con el escaramujo en polvo convencional

La Tabla 3 presenta las muestras de escaramujo en polvo analizadas mediante perfiles metabolómicos. Todas las muestras se fabricaron a partir de escaramujos de la especie Rosa Canina (conocida comúnmente como rosa silvestre),

Rosa moschata, y Rosa rubiginosa. Las muestras A y C son escaramujos en polvo fabricados mediante procedimientos convencionales, mientras que las muestras B y D son fabricadas según el procedimiento de la presente invención.

Tabla 3

Muestras analizadas		
Identificación de la muestra por el cliente:	Código de identificación de laboratorio:	Fecha de producción:
Muestra A, escaramujo en polvo especializado, Lote 201002	LN 8271	17/05/2011
Muestra B, cáscara de escaramujo en polvo especializado mejorado, lote 201003	LN 8272	17/05/2011
Muestra C, escaramujo en polvo especializado, Lote 201004	LN 8273	17/05/2011
Muestra D, cáscara de escaramujo en polvo especializado mejorado, lote 221011	LN 8343	16/08/2011

5 Materiales y procedimientos

Productos químicos

- n-hexano, para cromatografía de gases, Merck KGaA, Alemania
- Metanol, grado de gradiente para cromatografía líquida, Merck KGaA, Alemania
- Acetato de etilo Pestanal®, Fluka Analytical, Alemania
- 10 – Agua (purificada con un sistema de purificación Milli-Q de Millipore, Eschborn, Alemania)
- Polietilenglicol (peso molecular relativo promedio 600), Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania

Preparación de la muestra

Se colocó 1,00 g de cada muestra en una cubeta de plástico de 15 ml y se agitó automáticamente durante 5 minutos con:

- a) 5 ml de n-hexano (para la extracción de compuestos no polares)
- 15 b) mezcla de 8 ml de MeOH-H₂O (1:1, v/v) (para la extracción polar de compuestos)
- c) 8 ml de H₂O; el sobrenadante se extrajo con 3 ml de acetato de etilo (para el aislamiento de los flavonoides).

Las mezclas obtenidas después de la agitación se separaron mediante centrifugación (5 minutos, 11.000 rpm) y los sobrenadantes se colocaron en viales de color ámbar.

Condiciones de instrumentación y de medición

- 20 Para los experimentos, se usó un sistema DART-TOFMS que consistía en una fuente de iones DART (IonSense, Saugus, MA, USA), un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, de alta resolución, AccuTOF LP [JEOL (Europa), SAS, Croissy sur Seine, Francia] y un muestreador automático HTC PAL AutoDART-96 (Leap Technologies, Carrboro, NC, USA). Se usó helio como un gas de ionización.

- 25 Las condiciones de funcionamiento de la fuente de iones DART se resumen en la Tabla 4. La inserción de las muestras se llevó a cabo de manera automática usando muestreadores Dip-it™ (IonSense, Saugus, MA, USA). La varilla de vidrio de muestreo se sumergió durante 1 segundo en el orificio de muestras de una micro-placa de pocillos Deepwell (Life Systems Design, Merenschwand, Suiza) y se transfirió a la posición optimizada frente a la salida de la pistola DART. A continuación, la muestra se desorbó de la superficie de la varilla de vidrio en 15 segundos, mientras se registraban los datos espectrales. Para realizar una compensación de la desviación de masas para realizar mediciones de masa precisas y cálculos elementales de composición, se insertó manualmente una solución de polietilenglicol de 500 µg ml⁻¹ solución en metanol al final de cada serie de análisis. Cada muestra se midió en modo de ion tanto positivo como negativo a una temperatura de 250°C.
- 30

Tabla 4

Condiciones de funcionamiento del sistema DART - TOFMS		
Parámetros DART:	Modo de ion positivo	Modo de ion negativo
Temperatura de ionización del gas	250°C	250°C
Flujo de gas de ionización	3 l/min	3 l/min
Tensión de electrodo de rejilla	+250 V	-350 V
Tiempo de desorción	15 s	15 s
Parámetro TOF-MS:	Modo de ion positivo	Modo de ion negativo
Tensión de cono	+20 V	+20 V
Tensión de pico	800 V	800 V
Tensión de detector	-2.500 V	-2.500 V
Tasa de adquisición	2,5 espectros s-1	2,5 espectros s-1
Intervalo de masas monitorizado m/z	50-1.000	50-1.000
Poder de resolución:	Aprox. 6.000 FWHM	Aprox. 6.000 FWHM

5 Se usó el software Mass Center versión 1.3 (2006) (JEOL, Tokio, Japón) para el procesamiento de datos. Los espectrales de masa se obtuvieron promediando los espectros de masa registrados durante la exposición de la muestra al plasma de gas DART; se restaron los iones de fondo y se realizó una corrección de la deriva de masas.

Resultados y discusión

Comparación de los perfiles metabolómicos medidos en modo positivo

Los espectros DART-TOFMS de las muestras individuales se muestran en las Figuras 5 a 7. Los compuestos biológicamente activos encontrados en las muestras de escaramujo en polvo se resumen en la Tabla 5.

10

Tabla 5

Compuestos biológicamente activos identificados en los espectros positivos			
Compuesto	Fórmula molecular	Ion medido	Masa exacta m/z
Catequina/epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	291.0869
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺	303.0505
Taxifolina	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	305.0661
β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	[M+H-H ₂ O] ⁺	397.3834
Ácidos triterpenoicos (ácido betulínico, oleanólico y ursólico)	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M+H-H ₂ O] ⁺	439.3576
β-caroteno/licopeno	C ₄₀ H ₅₆	[M+H] ⁺	537.4460
Ácido linolénico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	279.2324

Los espectros de los extractos de MeOH/H₂O (que contienen compuestos polares) de las cuatro muestras son muy similares y contienen los mismos iones principales (Figura 5).

En el extracto de acetato de etilo, se encontraron principalmente flavonoides (catequina/epicatequina, quercetina y

5 taxifolina) y compuestos no polares (Figura 6). Los tri-acilgliceroles (TAGs) (m/z 850 - 920) y sus fragmentos (m/z 570 - 640) dominan en el espectro de la muestra A, y pueden encontrarse también en el espectro de la muestra C. En los espectros de la muestra B y D, sólo pueden encontrarse trazas de iones de triacilglicerol. En todos estos espectros, se encontró un gran pico de ion ácido triterpenoico. Se encontró un pico bastante grande de β -sitosterol en los espectros de la muestras A y C. La muestra B parece tener la mayor proporción de flavonoides en comparación con otras sustancias. En general, los espectros de las muestras B y D son muy similares.

10 En el extracto de hexano, se encontraron los siguientes compuestos no polares: ácido linolénico, β -sitosterol y ácidos triterpenoicos en cada muestra, β -caroteno/licopeno tenía un pico grande sólo en los espectros de las muestras B y C, y el pico más pequeño en el espectro de la muestra D. Los espectros de las muestras B y D muestran una relación más alta de ácido triterpenoico a β -sitosterol. En el espectro de la muestra D, sólo se encontraron trazas de triacilgliceroles. Los espectros de extracto de hexano se muestran en la Figura 7.

Comparación de los perfiles metabolómicos medidos en el modo negativo

Los espectros DART-TOFMS de las muestras individuales se muestran en las Figuras 8 a 10. Los compuestos biológicamente activos encontrados en las muestras de escaramujo en polvo se resumen en la Tabla 6.

15

Tabla 6

Compuestos biológicamente activos identificados en los espectros negativos			
Compuesto	Fórmula molecular	Ion medido	Masa exacta
Ácido málico	C4H6O5	[M-H]-	133.0137
Ácido tartárico	C4H6O6	[M-H]-	149.0086
Ácido dehidroascórbico	C4H6O6	[M-H]-	173.0086
Ácido ascórbico	C6H8O6	[M-H]-	175.0243
Ácido cítrico	C6H8O7	[M-H]-	191.0192
Ácido linolénico	C18H30O2	[M-H]-	277.2168
Ácido linoleico	C18H32O2	[M-H]-	279.2324
Catequina/epicatequina	C15H14O6	[M-H]-	289.0712
Quercetina	C15H10O7	[M-H]-	301.0348
Taxifolina	C15H12O7	[M-H]-	303.0505
Ácidos triterpenoicos	C30H48O3	[M-H]-	455.3525

En las moléculas polares de los extractos de MeOH/H₂O, se encontraron principalmente ácidos orgánicos (ácido málico, ácido tartárico y ácido cítrico), y vitamina C (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico) en todas las muestras (Figura 8) y todos los espectros son similares.

20 Se encontraron los mismos flavonoides en el extracto de acetato de etilo como en el modo positivo. Además, se encontraron grandes picos de ácidos triterpenoicos en todos estos espectros. En los espectros de la muestra A, se encontró también ácido linolénico (Figura 9).

25 En los espectros de los extractos de hexano se encontraron principalmente ácidos grasos y ácidos triterpenoicos. Tal como puede observarse en la Figura 10, la muestra A tiene intensidades de iones mucho más altas de iones de ácidos grasos que de iones de ácidos triterpenoicos en comparación con otras muestras. En ambos espectros de las muestras B y D, el pico de los ácidos triterpenoicos era el más dominante.

Sumario de resultados

30 Las diferencias principales entre estas muestras radicaban en el contenido de triglicéridos y ácidos grasos. La muestra A se muestra el contenido más alto de TAGs y, por el contrario, parece que la muestra B y D tiene el menor contenido de TAG. Estos compuestos pueden provenir de semillas que pueden estar presentes en las muestras A y C. En las muestras

B y D, es evidente que hay presente una mayor cantidad de flavonoides y ácidos triterpenoicos.

Ejemplo 4

Determinación de los flavonoides en el escaramujo en polvo

Materiales y procedimientos

5 Productos químicos

- Metanol, grado de gradiente para cromatografía líquida, Merck KGaA, Alemania
- Acido fórmico, p.a., 98%, Fluka analytical, Alemania
- Acetonitrilo, grado de gradiente para HPLC, ≥99.9%, Sigma-Aldrich, Alemania
- Agua (purificada con un sistema de purificación Milli-Q de Millipore, Eschborn, Alemania)
- 10 - (+) – Hidrato de catequina ≥98% (HPLC), en polvo, Sigma-Aldrich, Alemania
- Quercetina ≥98% (HPLC), Sigma-Aldrich, Alemania
- Trihidrato de rutina ≥90% (HPLC), Sigma-Aldrich, Alemania

Preparación de la muestra

15 Se extrajo 1 g de la muestra con una solución al 5% de ácido fórmico en metanol. Se evaporó una alícuota hasta la sequedad y se disolvió en una mezcla de acetonitrilo/agua (1/1, v/v). La solución se filtró a través de un micro filtro de 5 µm a un vial de color ámbar.

Instrumentación y condiciones de medición

Los flavonoides se determinaron mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada con el espectrómetro de masas en tándem.

20 Instrumento: Sistema UPLC: UPLC, Waters, USA

Detector: AB SCIEX QTRAP® 5500, AB SCIEX, USA

Columna: Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm), Waters, USA

Fase móvil:

A. 0,6% de ácido fórmico en agua.

25 B. 0,6% de ácido fórmico en acetonitrilo

Detección: MS/MS (ESI-)

Condiciones de detector:

Analito	Ion primario (m/z)	Ion secundario (m/z)	DP ^a (V)	CE ^b (V)	CXP ^c (V)
Rutina	608,9	300,0	-205	-50	-13
		271,1	-205	-72	-13
		255,0	-205	-70	-11

(Cont.)

Catequina	288,9	245,0	-145	-22	-11
		108,9	-145	-34	-9
		123,1	-145	-40	-9
Quercetina	300,9	151,1	-115	-30	7
		179,0	-115	-26	-11
		107,0	-115	-38	-5
^a Potencial de desagrupación					
^b Energía de colisión					
^c Potencial de salida de la célula					

Resultados

- 5 La catequina era el principal de los flavonoides monitorizados. Los niveles más altos de todos los flavonoides se encontraron en la muestra D, seguido de la muestra B. El contenido en flavonoides se resume en la Tabla 7 y la comparación gráfica se muestra en la Figura 11.

Tabla 7

Contenido de flavonoides en los polvos de escaramujo						
Muestra	Lote	Código de identificación de laboratorio:	Rutina (mg kg⁻¹)	Catequina (mg kg⁻¹)	Quercetina (mg kg⁻¹)	SUMA de los flavonoides (mg kg⁻¹)
A	201002	LN 8271	11,2	606,0	6,0	623,2
B	201003	LN 8272	28,0	950,0	34,4	1.012,4
C	201002	LN 8273	14,8	798,0	8,8	821,6
D	221011	LN 8343	31,0	1.020,0	36,6	1.087,6

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de fabricación de escaramujo seco en polvo que comprende las etapas de

- proporcionar escaramujo cosechado,
- secar y triturar el escaramujo,
- 5 – separar el escaramujo triturado y aislar las cáscaras,
- moler las cáscaras, y
- opcionalmente, tamizar las cáscaras de escaramujo molidas a un tamaño de partícula inferior a 1 mm,

10 en el que la refrigeración se aplica durante la etapa de molido, de manera que el molido se realice a una temperatura constante, siendo dicha temperatura inferior a 40°C, preferentemente inferior a 30°C, más preferentemente inferior a 25°C, incluso más preferentemente inferior a 20°C.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la refrigeración aplicada es una refrigeración con aire.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, que comprende además la etapa de mezclar el escaramujo molido con vitamina C en una cantidad de 30 mg adicionales de vitamina C por g de escaramujo en polvo a aproximadamente 80 mg por cada g de escaramujo en polvo, tal como aproximadamente 40 mg adicionales de vitamina C a 1 g de escaramujo en polvo.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los escaramujos se obtienen a partir de una cualquiera de las especies de plantas pertenecientes a la familia de la Rosa, tal como Rosa canina, Rosa mochatata, Rosa rubiginosa, Rosa gallica, Rosa conditata, Rosa rugosa, Rosa hugonis, Rosa nitida, Rosa pendulina, Rosa pimpinellifolia y Rosa sericea y cualquiera de sus mezclas.

20

Fig. 1

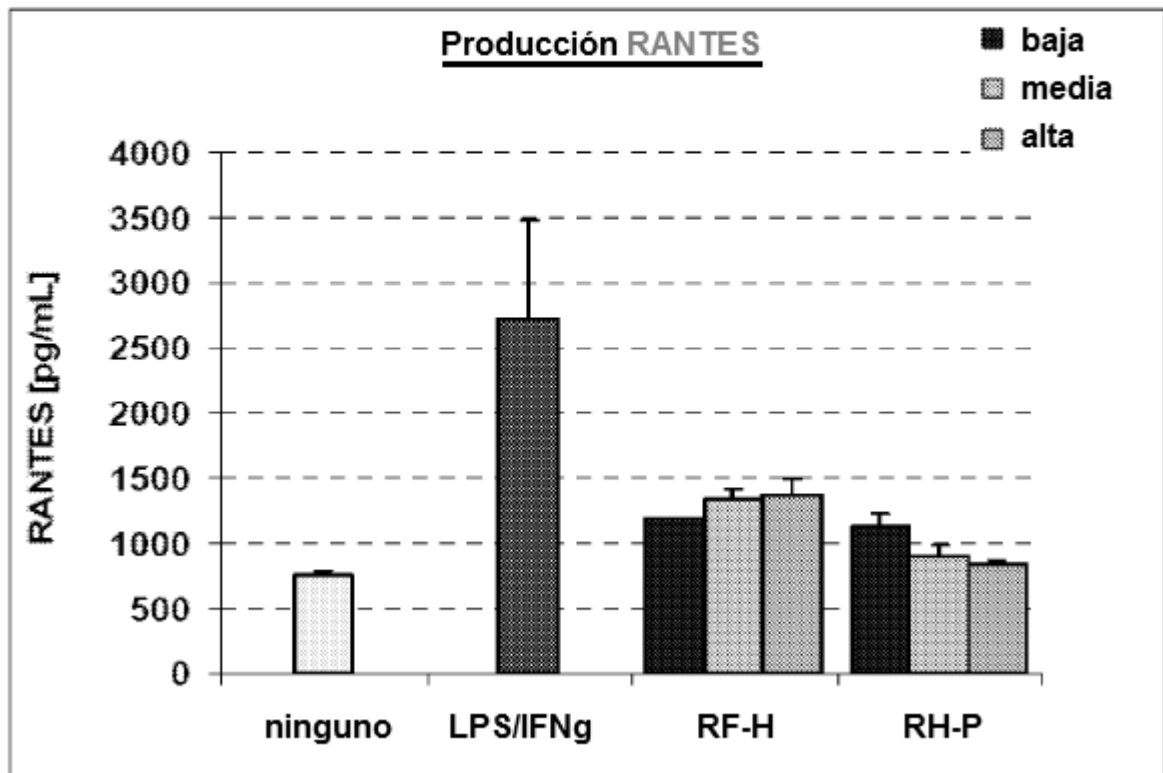


Fig. 2

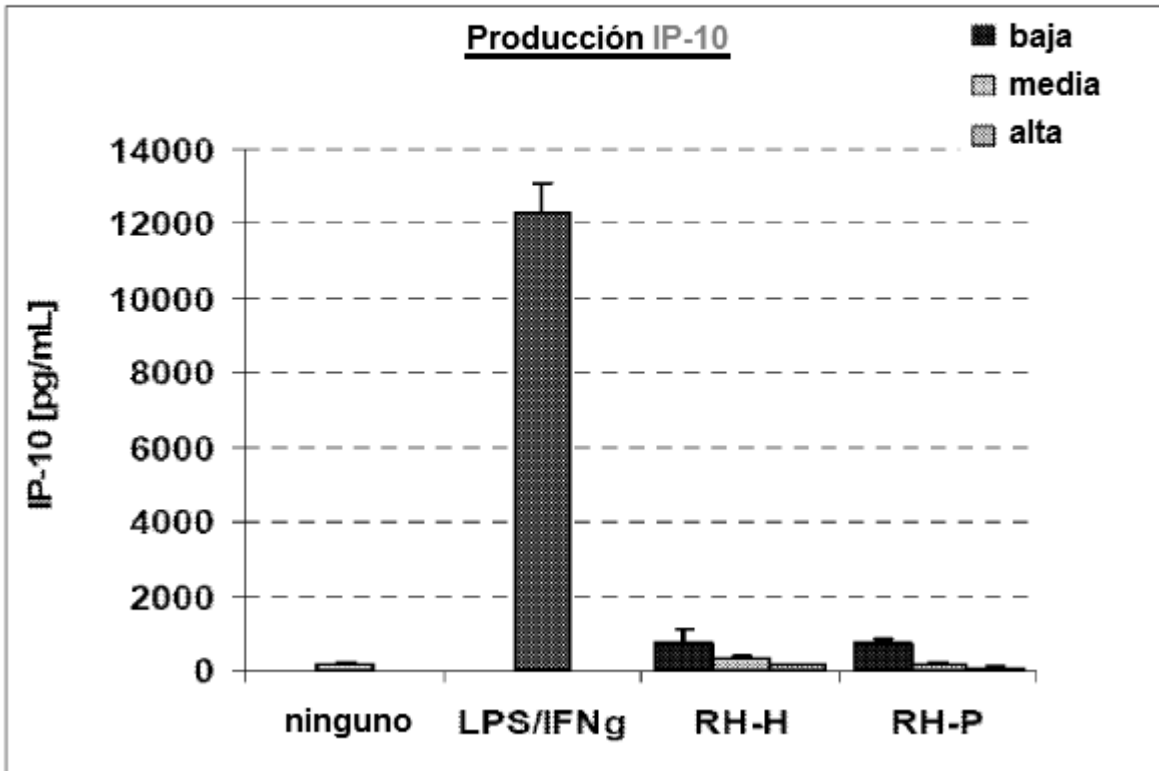


Fig. 3

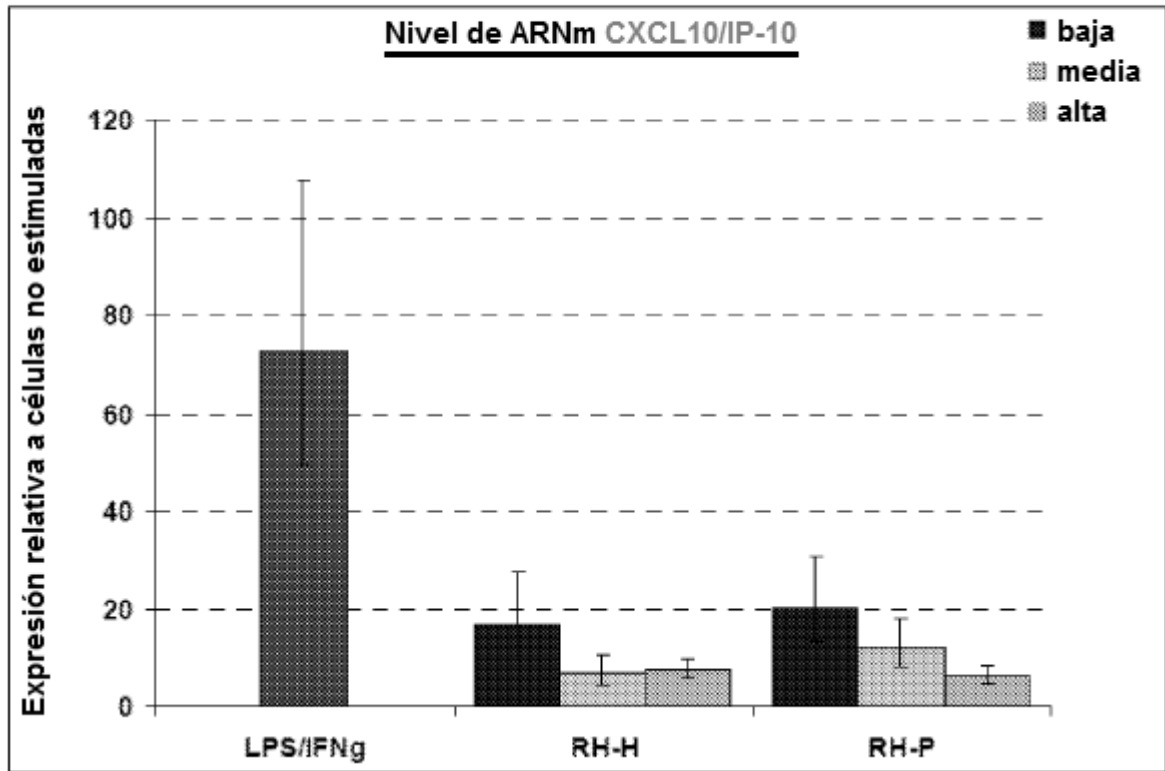


Fig. 4

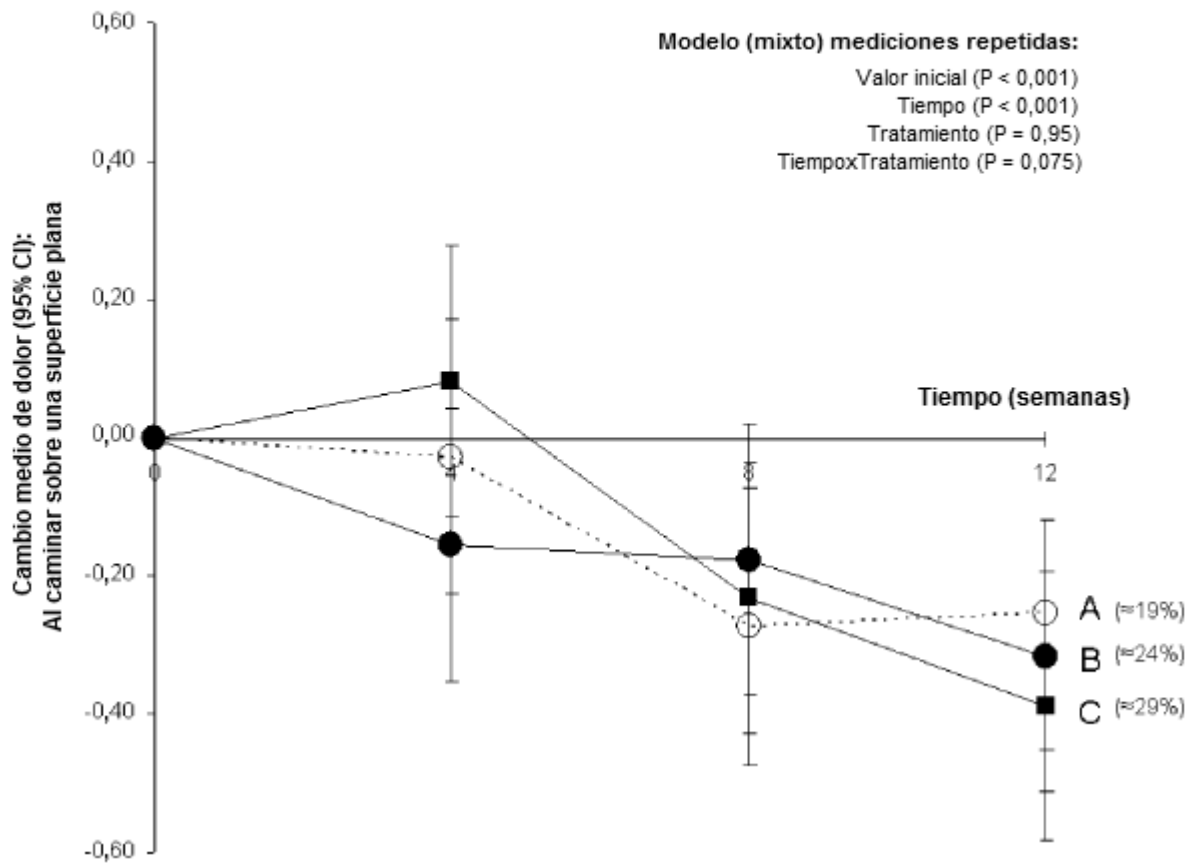
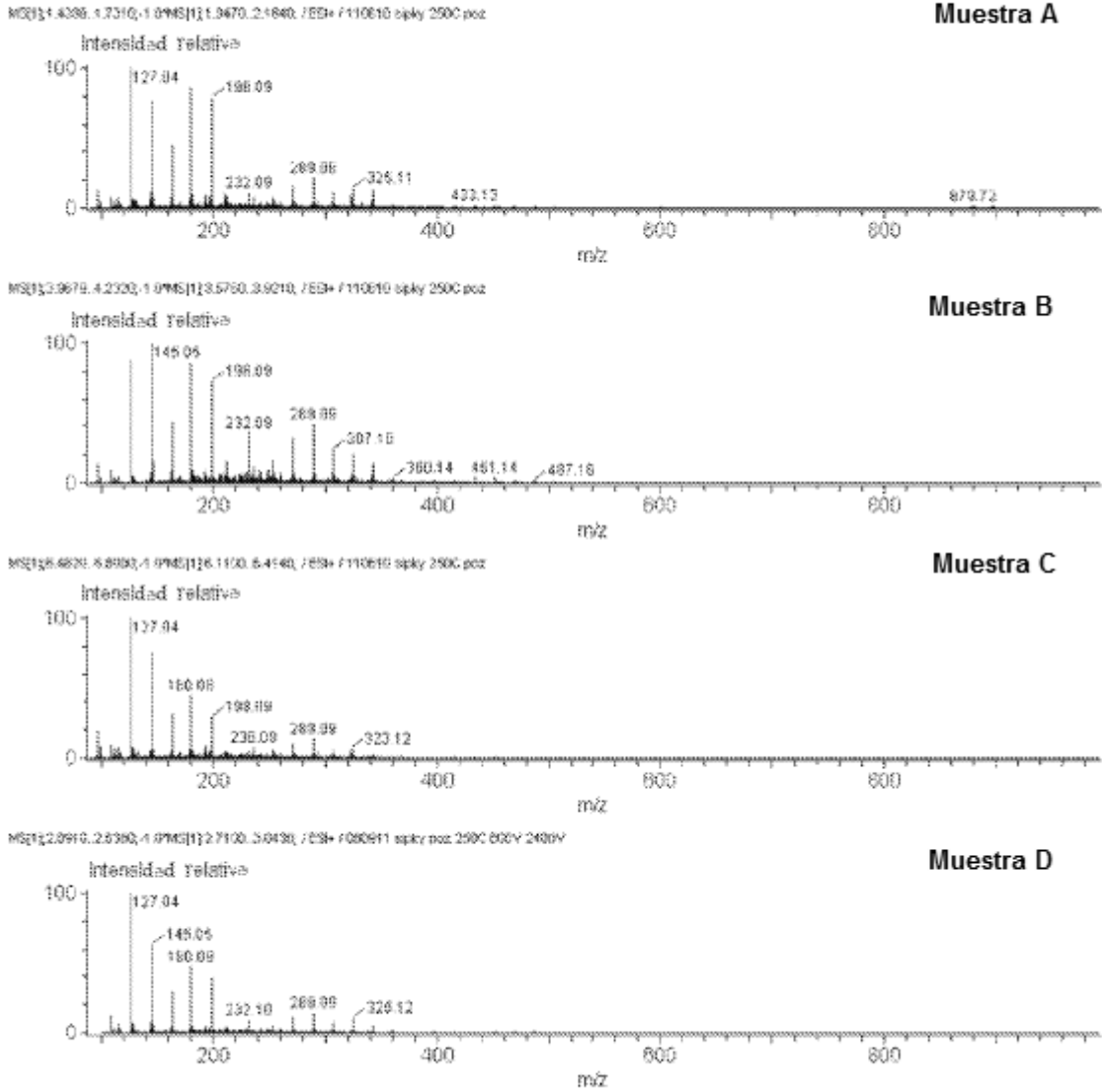
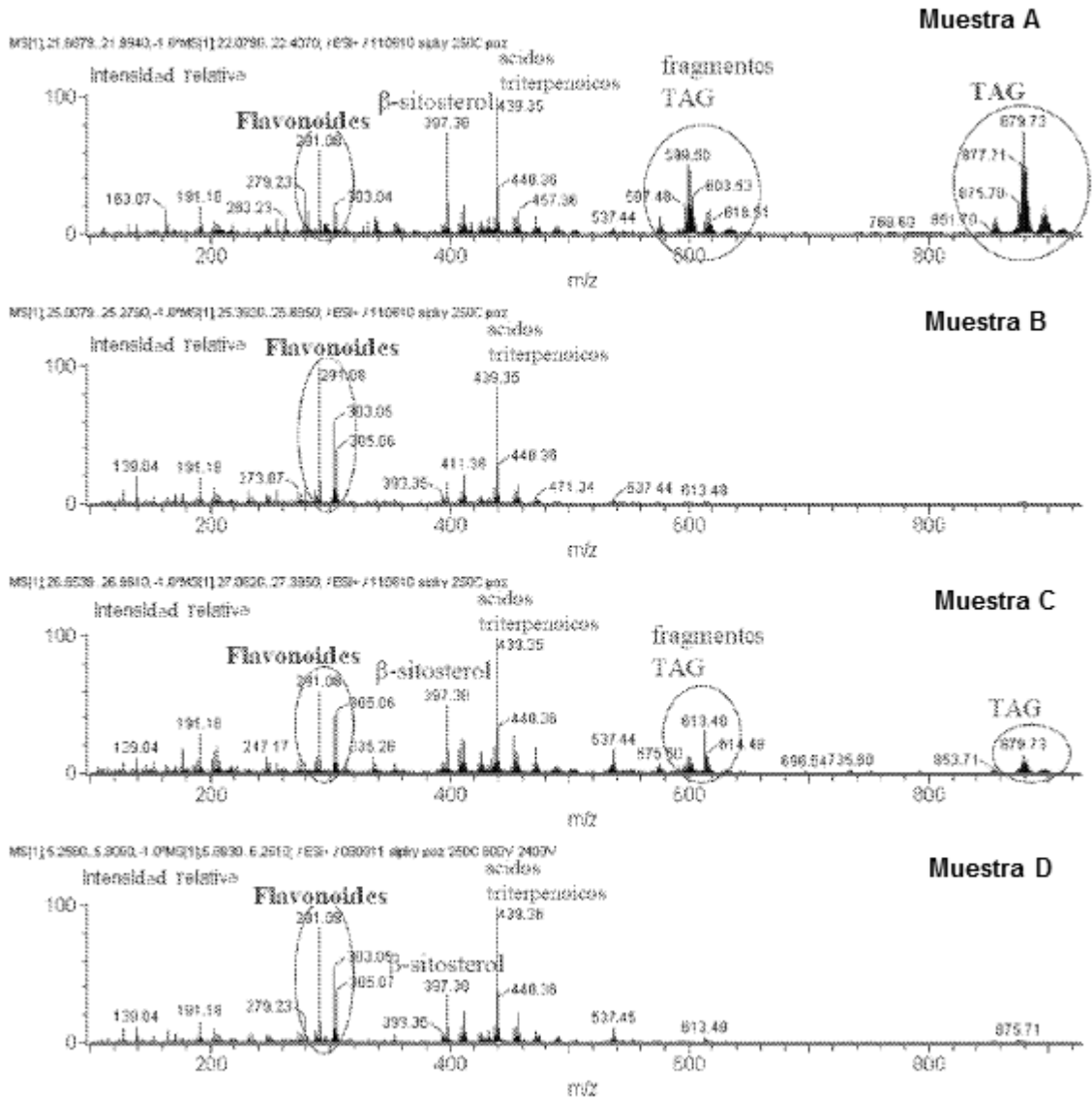


Fig. 5



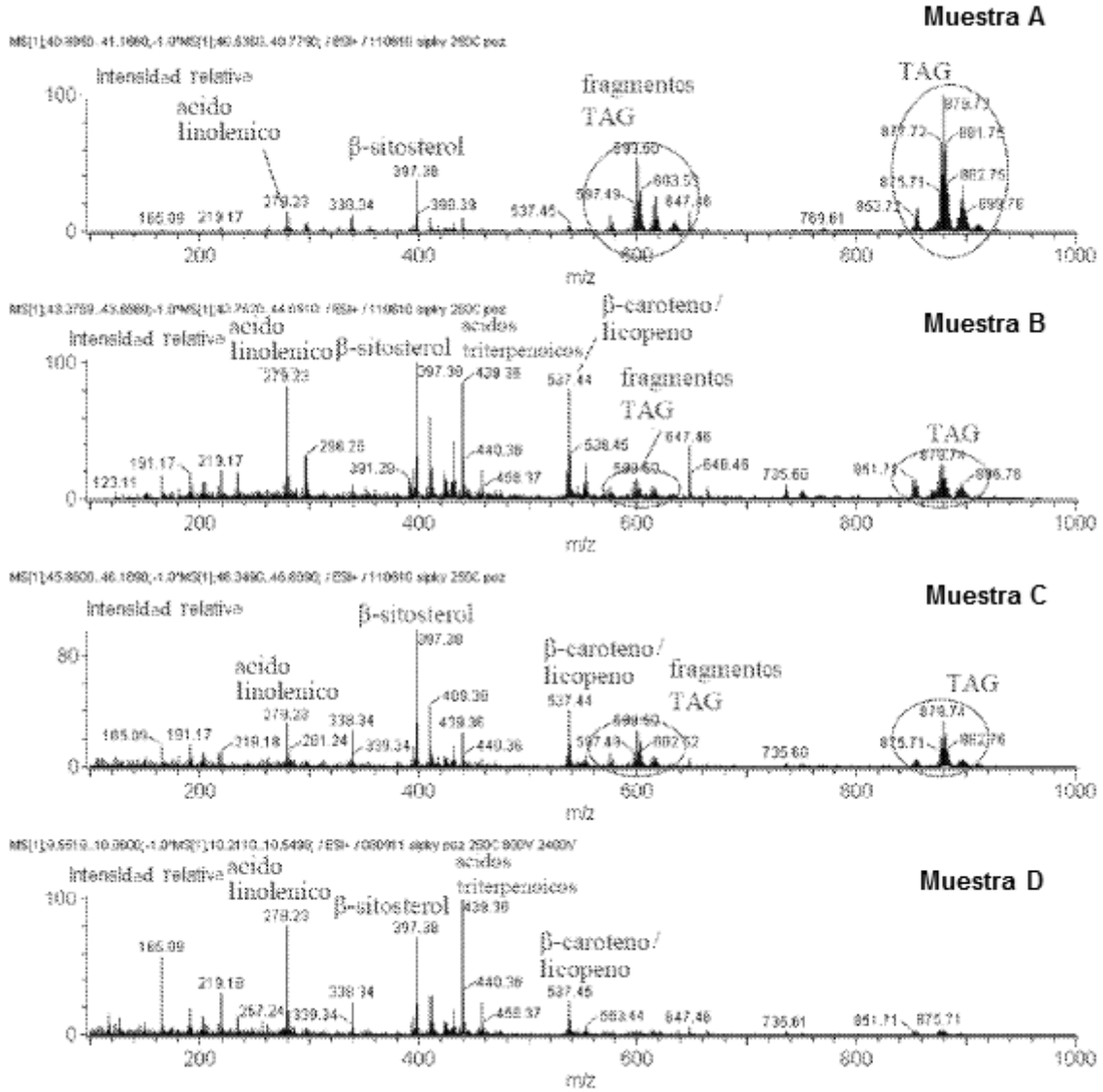
Extracto de MeOH/H2O de muestras de escaramujo (modo ión positivo, 250°C)

Fig. 6



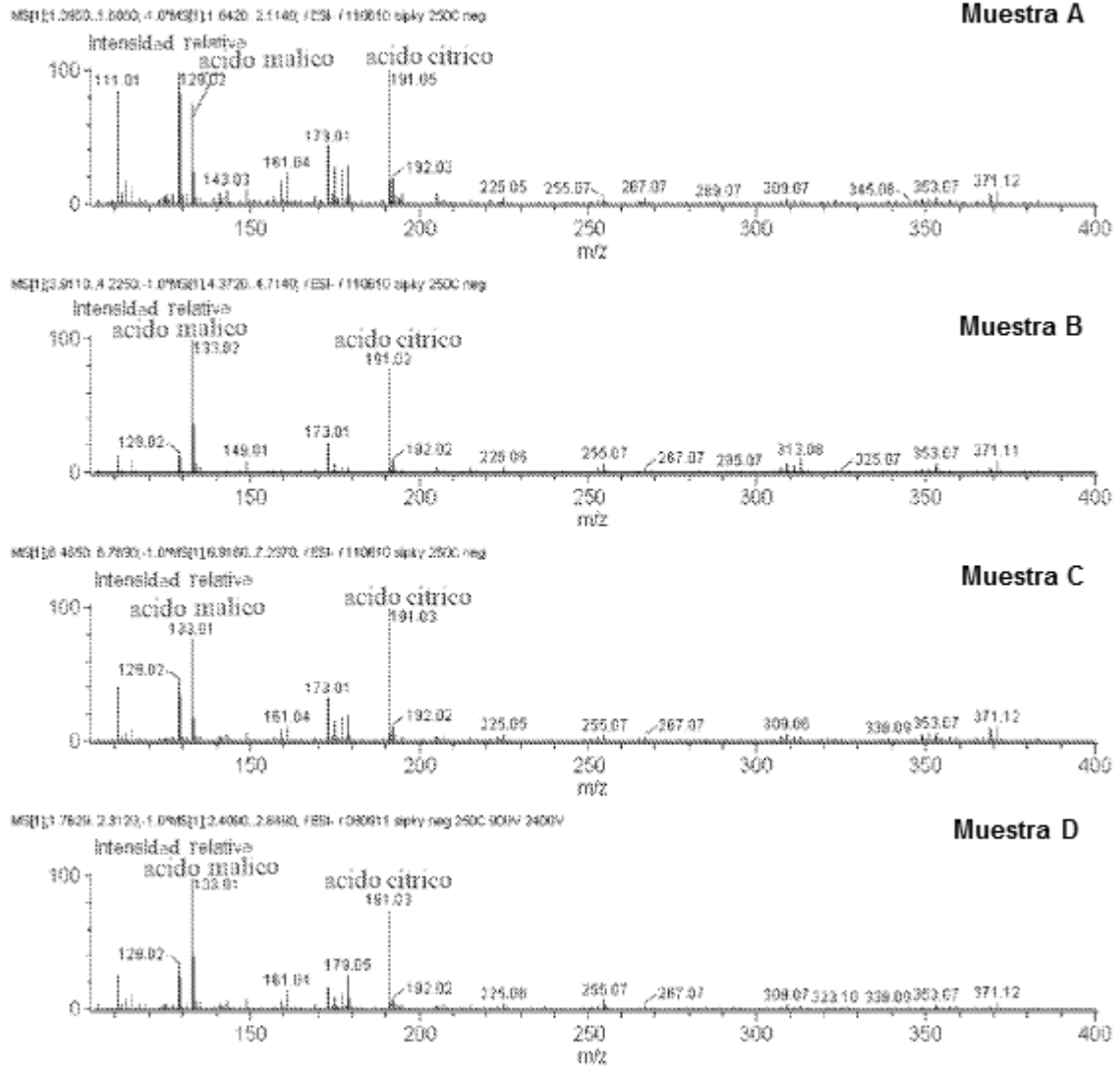
Extracto de acetato de etilo de muestras de escaramujo (modo ión positivo, 250°C)

Fig. 7



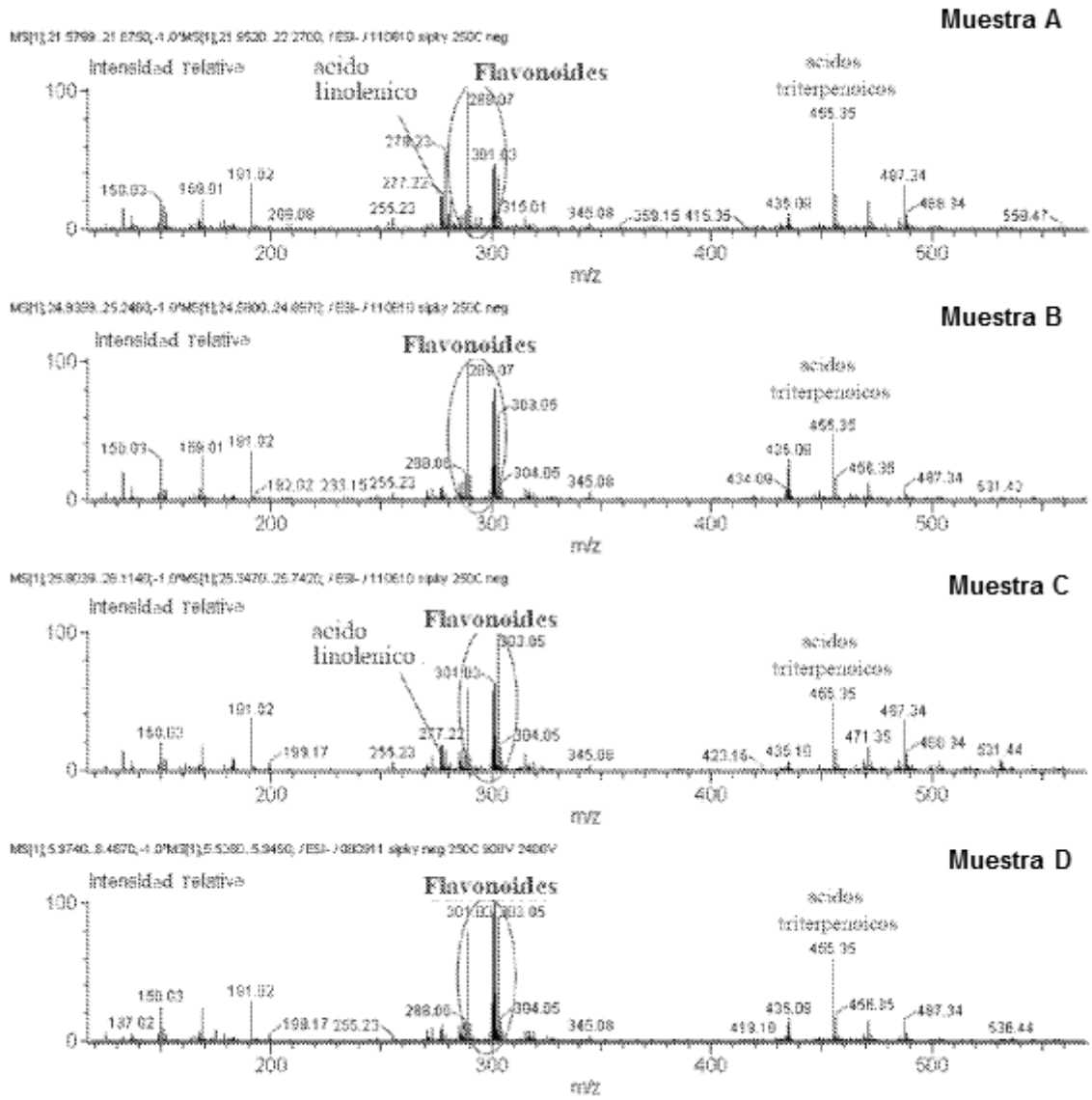
Extracto de hexano de muestras de escaramujo (modo i3n positivo, 250°C)

Fig. 8



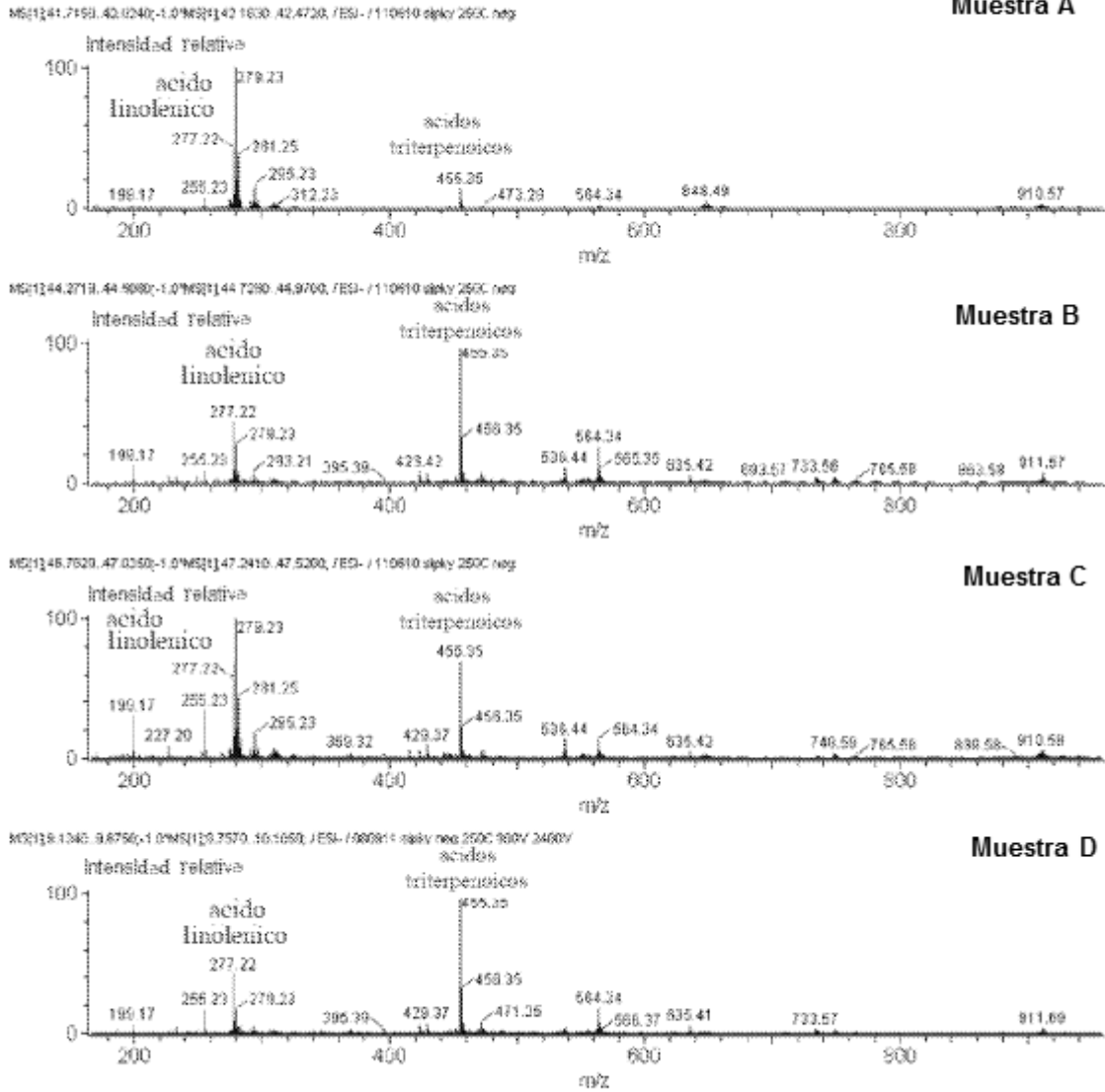
Extracto de MeOH/H2O de muestras de escaramujo (modo ión negativo, 250°C)

Fig. 9



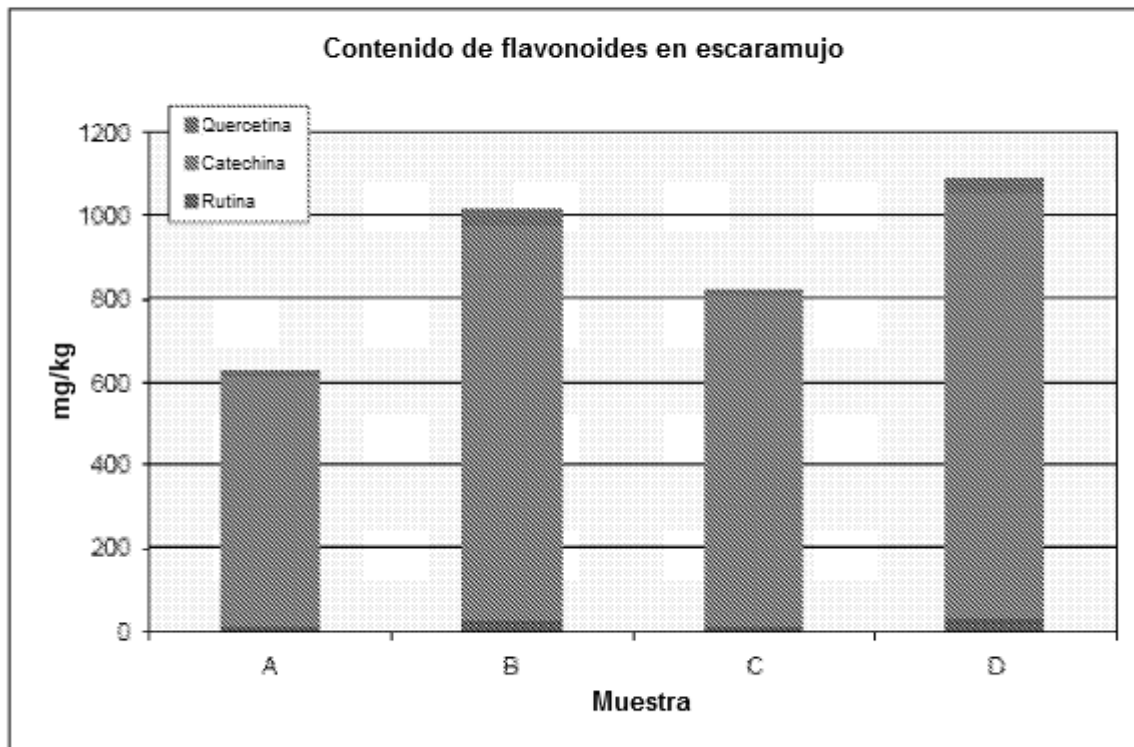
Extracto de acetato de etilo de muestras de escamaju (modo ión negativo, 250°C)

Fig. 10



Extracto de hexano de muestras de escaramujo (modo ión negativo, 250°C)

Fig. 11



Contenido de flavonoides en escaramujo en polvo