

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 579**

21 Número de solicitud: 201731147

51 Int. Cl.:

**A61K 36/85** (2006.01)  
**A61K 36/185** (2006.01)  
**A23L 33/105** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**25.09.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.04.2018**

71 Solicitantes:

**MONTELOEDER, S.L. (100.0%)**  
**Miguel Servet, 16 nave 17**  
**03203 Elche (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**HERRANZ LÓPEZ, María;**  
**ROCHE COLLADO, Enrique;**  
**MICOL MOLINA, Vicente;**  
**JONES BARBERÁ , Jonathan Richard y**  
**CATURLA CERNUDA , Nuria**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN ÁLVAREZ, Juan Enrique**

54 Título: **Composición para el control del peso a través de la modulación de los niveles de péptidos involucrados en saciedad y/o apetito.**

57 Resumen:

La presente invención aporta unas composiciones que comprenden un extracto con al menos un 5% en peso de antocianinas y un extracto con al menos un 15% en peso de fenilpropanoides que resultan especialmente indicadas para su uso en periodos de reducción de peso debido a que reducen el apetito y aumentan la saciedad mediante una modificación de los niveles de hormonas segregadas por el tracto digestivo. De forma paralela o complementaria, estas composiciones actúan sobre el metabolismo de los lípidos en las células de tejido adiposo mediante la activación de AMPK y los procesos de oxidación y eliminación de lípidos. Dicha composición se obtiene mediante la extracción hidroalcohólica de flor de rosella y hoja de hierba Luisa, empleando en el caso de la hierba Luisa concentraciones de alcohol (etanol, metanol, propanol, isopropanol o butanol) superiores al 70 y hasta el 100% en volumen.

ES 2 661 579 A1

## DESCRIPCIÓN

Composición para el control del peso a través de la modulación de los niveles de péptidos involucrados en saciedad y/o apetito.

5

### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca dentro de los siguientes campos técnicos: suplementos nutricionales, alimentación funcional, preparado farmacéutico, y uso animal; para controlar el peso corporal y el apetito, en particular, de utilidad para personas con sobrepeso u obesidad. En particular, se refiere a una composición que incluye dos extractos polifenólicos de plantas.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La obesidad ha sido calificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una epidemia global asociada a varios desequilibrios metabólicos, que producen un aumento de la masa de tejido adiposo, disfunción del endotelio, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis y resistencia a la insulina. En conjunto, estos desequilibrios constituyen una patología compleja conocida mundialmente con el término de síndrome metabólico.

20

La obesidad se define como una condición de excesiva acumulación de grasa en el tejido adiposo, que conlleva un riesgo para la salud y predispone a una resistencia frente a la insulina, hipertensión y dislipidemia. Está generalmente aceptado que la única opción para prevenir el desarrollo de alteraciones derivadas de la obesidad es restringir la ingesta de calorías y aumentar la actividad física. Sin embargo, estos cambios en el modo de vida no son factibles debido a que el envejecimiento viene asociado a una reducción de masa muscular y gasto metabólico en reposo.

25

30

La obesidad se trata generalmente mediante una combinación de métodos, que incluyen adoptar una dieta saludable, ejercicio y apoyo psicológico para conseguir objetivos tangibles de reducción de peso y un control metabólico eficiente de esta patología. Sin embargo, estos métodos son difíciles de llevar a cabo entre la población con sobrepeso a largo plazo, debido a que los individuos bajo tratamiento tienden a abandonarlo y a recuperar el peso perdido. Además, un periodo de pérdida de peso viene acompañado por una adaptación corporal a los nuevos requerimientos metabólicos. Se produce un déficit de energía entre el consumo y el gasto calórico que estimula la producción de ghrelina para inducir apetito y provocar un mayor consumo de alimentos, al mismo tiempo que se reduce el consumo energético metabólico en letargo y se incrementa la eficiencia energética (reducción del consumo de energía cuando se está activo). A largo plazo, esto implica que el cuerpo tiende a consumir menos calorías y aumenta considerablemente el apetito, con lo que se producen los conocidos "rebotes", en los que se vuelve a consumir igual o más alimentos que antes de empezar la dieta y el cuerpo no consigue quemar las calorías al mismo ritmo que antes de la dieta, con la consecuencia de que se vuelve a recuperar el peso perdido o incluso a superarlo. Es necesario, por tanto, modular el metabolismo para evitar el incremento del apetito en periodos de

35

40

45

dieta y reducción de peso y evitar o reducir las recaídas en los tratamientos de la obesidad y el sobrepeso.

5 La obesidad es una patología muy compleja en la que intervienen numerosos factores como la presencia de un componente inflamatorio crónico y de baja intensidad, un metabolismo energético alterado y un desequilibrio oxidativo. Esta complejidad es parte del motivo por el que los reajustes del peso y el metabolismo son procesos muy lentos. En numerosas ocasiones esto conlleva que se recurra a métodos complementarios para lograr la reducción de peso deseada, tales como la  
10 cirugía bariátrica, los tratamientos farmacológicos y la intervención nutricional con suplementos dietéticos o nutracéuticos.

15 Los inconvenientes de la cirugía bariátrica son los propios de cualquier intervención quirúrgica, llegándose a dar incluso casos de muerte durante el procedimiento. Los inconvenientes de los tratamientos farmacéuticos son también de sobra conocidos por los llamados “efectos secundarios”, que siempre pueden presentarse en mayor o menor medida. Además, en el mercado existen numerosos productos nutracéuticos y suplementos dietéticos de los que se preconizan sus efectos de reducción de peso, de “quemar” la grasa e incluso de reducir el apetito, cuyos  
20 efectos no están demostrados científicamente, son dudosos o en el mejor de los casos es debido a un efecto placebo o de autosugestión.

## RESUMEN DE LA INVENCION

25 Un primer aspecto de la invención aporta una composición para su uso en la modulación de la ingesta de alimentos de un individuo mediante reducción del apetito y/o aumento de la saciedad a través de una modificación de los niveles de péptidos relacionados con el apetito segregados por el tracto digestivo y tejido  
30 adiposo del individuo, caracterizada porque dicha composición comprende un extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas y un extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides.

35 Una composición que contiene ambos extractos mencionados anteriormente es enormemente efectiva en la modulación de la ingesta de alimentos porque produce efectos saciantes y/o reductores del apetito, mediante su efecto en los niveles de péptidos segregados por el tracto digestivo, que provocan sensaciones de saciedad y/o apetito. Con dicha composición es posible reducir los efectos negativos de las estrategias de control y mantenimiento de peso; por ejemplo, es posible reducir el  
40 apetito durante un periodo de reducción de peso y así evitar o reducir las posibilidades de que el individuo a dieta comience a ingerir alimentos en mayor cantidad de la recomendada y vuelva a subir de peso. Igualmente, esta composición es muy útil en las estrategias de mantenimiento de peso, una vez que se ha alcanzado el peso deseado, esta composición ayuda a mantener la sensación de  
45 saciedad por más tiempo, y por lo tanto, se consigue modular la ingesta de alimentos al nivel deseado, por ejemplo, para mantener el peso (o reducirlo más, si es necesario).

Preferiblemente el extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas contiene alrededor de un 10 % en antocianinas.

5 Preferiblemente el extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides contiene alrededor de un 30 % de fenilpropanoides.

Estas concentraciones en antocianinas y fenilpropanoides garantizan que la composición utilizada no sea citotóxica.

10 Preferiblemente el extracto con antocianinas comprende un extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

15 Preferiblemente el extracto con fenilpropanoides comprende un extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*).

En el estado de la técnica no están claramente definidos los efectos sobre el apetito y la saciedad de los extractos de hierbaluisa y de rosella por separado. Hay fuentes que consideran que tienen efectos de aumentar el apetito y reducen la saciedad y fuentes que consideran que disminuyen el apetito y aumentan la saciedad. En la presente memoria se podrá comprobar que una composición con ambos extractos tiene un potente efecto de modificar la expresión de péptidos que intervienen en la regulación de la ingesta de alimentos (apetito y saciedad), como por ejemplo la ghrelina y la leptina y que en comparación con dosis equivalentes de estos extractos administrados por separado, producen un efecto muy significativamente mayor. 20 Dados los efectos ambiguos de ambos extractos por separado, es altamente sorprendente e inesperado el efecto saciante y de reducción del apetito conseguido por las composiciones que contienen ambos extractos.

30 La rosella es una planta rica en antocianinas y su extracto combinado con el extracto de hierbaluisa, que es una planta rica en fenilpropanoides produce un marcado efecto saciante y/o de reducción del apetito.

35 La composición puede comprender un mínimo de 50 % en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y mínimo de 25 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

40 Preferiblemente la composición comprende alrededor de un 65 % en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y alrededor de un 35 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

Este porcentaje de ambos extractos produce que la composición tenga un efecto mayor sobre la activación del metabolismo de las grasas mediado por una mayor activación de AMPK en comparación con una composición donde los extractos están mezclados a partes iguales.

45 La composición puede ser administrada en una dosis de 250 a 1000 miligramos al día.

Preferiblemente la composición se administra en una dosis de 500 mg al día.

5 Estas dosis aseguran un efecto sobre los péptidos relacionados con el apetito y segregados por el tracto digestivo y tejido adiposo del individuo, lo que se traduce en una reducción del apetito y/o aumento de la saciedad que se refleja en una disminución de la necesidad de ingesta de alimentos.

10 Un segundo aspecto de la invención aporta una composición para su uso en la reducción de peso de un individuo mediante una modificación en el metabolismo de lípidos mediada por una activación de los sensores energéticos de proteína quinasa activados por AMP (AMPK) del individuo que se traduce en una reducción del porcentaje de grasa corporal, caracterizada porque dicha composición comprende un extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas y un extracto con al  
15 menos un 15 % en peso de fenilpropanoides.

Una composición que contiene ambos extractos mencionados anteriormente es enormemente efectiva en la reducción de peso de un individuo mediante un cambio o mejora en el metabolismo de los lípidos a través de la activación de los sensores  
20 energéticos de proteína quinasa activados por AMP (AMPK). Esta composición es muy útil en el tratamiento de la obesidad, al ser capaz de reducir la cantidad de tejido adiposo de un individuo y mejorar otros parámetros típicamente relacionados con la obesidad o el sobrepeso.

25 AMPK es una quinasa de serina/treonina que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular. Su activación conlleva la activación de procesos catabólicos tales como la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos y la inhibición de procesos anabólicos tales como la lipogénesis y la glucogénesis.

30 Preferiblemente el extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas contiene alrededor de un 10 % en antocianinas.

Preferiblemente el extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides contiene alrededor de un 30 % de fenilpropanoides.  
35

Estas concentraciones en antocianinas y fenilpropanoides garantizan que la composición utilizada no sea citotóxica.

40 Preferiblemente el extracto antocianinas comprende un extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

Preferiblemente el extracto fenilpropanoides comprende un extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*).

45 Se ha demostrado que las antocianinas de Rosella son particularmente efectivas en la reducción de la inflamación ligada al estrés metabólico por la inhibición de secreción de leptina y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), que son

adipoquinas importantes que regulan la migración de macrófagos no residentes al tejido adiposo y la inflamación sistémica general. Los extractos polifenólicos de Rosella también previenen la esteatosis hepática en ratones hiperlipidémicos a través de la modulación de la expresión de los genes involucrados en la homeostasis de glucosa y lípidos. En ratones alimentados con una dieta alta en grasas, las antocianinas de Rosella atenúan el incremento de glucosa en sangre y el aumento aparente de la resistencia a la insulina, así como incrementan el ritmo respiratorio, que está íntimamente relacionado con el ritmo metabólico basal (BMR). En este mismo modelo animal también se observó una reducción en la expresión de genes lipogénicos, tales como la sintasa de ácidos grasos (FASN) y la proteína ligante del elemento regulador del sterol (Srebp-1c), simultáneamente a una activación de AMPK hepático.

Se sabe que la activación de AMPK hepático induce la expresión del gen PPARGC1A y mejora directamente su actividad mediante fosforilación, lo cual incrementa la biogénesis y la función mitocondrial. Esto implica que las antocianinas de Rosella actúan sobre la modulación del uso de grasa, mas probablemente por la inhibición de la lipogénesis y la activación de la lipólisis a nivel de la biogénesis mitocondrial. Todos estos procesos se parecen a una situación metabólica que refleja una elevada demanda energética celular, un gasto energético mejorado y un ritmo metabólico basal más elevado.

Por otra parte, los fenilpropanoides del extracto de hierbaluisa y su componente mayoritario el verbascósido mejora las alteraciones metabólicas inducidas por un elevado nivel de glucosa. Estos efectos son mediados por una regulación positiva transcripcional dependiente de PPARy de adiponectina y una potente activación de AMPK, una regulación positiva de PPAR-  $\alpha$  expresada por mRNA y una regulación negativa de FASN. Los experimentos realizados en ratones indican una mejora en el metabolismo de las grasas (colesterol y triglicéridos), especialmente en la eliminación de triglicéridos.

Esto indica un efecto complementario hasta ahora desconocido de ambos extractos en el metabolismo de la grasa y en la activación de AMPK. Esto implica que una composición como la descrita anteriormente tiene un efecto inesperado y muy significativo en la reducción de peso de personas con obesidad u sobrepeso, como se explica en los ejemplos.

La composición puede comprender un mínimo de 50 % en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y un mínimo de 25 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

Preferiblemente la composición comprende alrededor de un 65 % en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y alrededor de un 35 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

Este porcentaje de ambos extractos produce que la composición tenga un efecto mayor sobre la activación del metabolismo de las grasas mediado por una mayor activación de AMPK en comparación con una composición donde los extractos están mezclados a partes iguales.

5

La composición puede ser administrada en una dosis de 250 a 1000 miligramos al día.

Preferiblemente la composición se administra en una dosis de 500 mg al día.

10

Esta dosis asegura un efecto significativo sobre la activación de AMPK que se traduce en una activación del metabolismo de lípidos y en consecuencia en una reducción de porcentaje de grasa corporal.

15

En una realización más en particular, la administración de la composición de la presente invención se selecciona de entre vía parenteral, transdermal, oral, tópica, intracolónica o vaginal.

20

En una realización más en particular, la composición de la presente invención se administra vía parenteral en combinación con vehículos líquidos inyectables convencionales, tales como agua o alcoholes adecuados. Los adyuvantes farmacéuticos convencionales para inyección, tales como agentes estabilizadores, agentes solubilizantes y tampones pueden incluirse en tales composiciones inyectables. En una realización más en particular, la composición de la presente invención se administra por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía intravenosa.

25

30

En una realización más en particular, la composición de la presente invención se administra por vía oral conteniendo uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles, en forma sólida o líquida. Estas composiciones pueden contener componentes convencionales tales como agentes de unión, cargas, lubricantes y agentes humectantes fisiológicamente aceptables. Las composiciones pueden tomar cualquier forma apropiada, tales como comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas para chupar, disoluciones aceitosas o acuosas, suspensiones, emulsiones o en forma en polvo seco adecuada para la reconstitución con agua u otro medio líquido adecuado antes del uso, para la liberación inmediata o controlada.

35

40

En una realización más en particular de la presente invención, las formas orales líquidas para la administración también pueden contener determinados aditivos tales como edulcorantes, aromatizantes, conservantes y agentes emulsionantes. Las composiciones líquidas no acuosas para la administración oral pueden formularse también, conteniendo por ejemplo aceites comestibles. Tales composiciones líquidas pueden encapsularse de manera conveniente en, por ejemplo, cápsulas de gelatina en una cantidad de dosificación unitaria.

45

50

En una realización más en particular, la dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención es diaria para seres humanos y animales y puede variar dependiendo de la edad, el peso o grado de enfermedad etc. La dosificación diaria para mamíferos, incluyendo a los seres humanos, oscila normalmente desde 250

miligramo hasta 1000 miligramos, preferiblemente a 500 mg de sustancia que va a administrarse durante una o varias ingestiones.

5 Un tercer aspecto de la invención aporta un método de producción de una composición que comprende un extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas y un extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides caracterizado porque comprende una extracción hidroalcohólica de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y una extracción hidroalcohólica de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).

10 Este método utiliza dos fuentes naturales ricas en los compuestos activos de la composición. La extracción hidroalcohólica de estas plantas permite obtener con un rendimiento notable y económicamente viable el contenido en activos requerido.

15 La extracción hidroalcohólica de hierbaluisa puede efectuarse usando una disolución de alcohol en agua con un contenido en alcohol mayor del 70 % y hasta el 100% en volumen de etanol durante dos horas a una temperatura entre 40 y 80 °C.

20 Preferiblemente la disolución de etanol en agua contiene alrededor del 70 % en volumen de alcohol.

25 Esta composición del agente de extracción y las condiciones de extracción maximizan la obtención de los compuestos fenilpropanóicos, en particular el verbascósido de las hojas de hierbaluisa en condiciones económicamente viables sin tener que destilar un exceso de alcohol o agua.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Figura 1. Gráfico que representa el porcentaje de acumulación de triglicéridos en adipocitos resistentes a la insulina hipertróficos.

35 Figura 2. Gráfico que representa el porcentaje de activación de AMPK en adipocitos resistentes a la insulina hipertróficos tratados con diferentes concentraciones de extractos de rosella y hierbaluisa.

40 Figura 3. Gráfico que representa el porcentaje de activación de AMPK en adipocitos resistentes a la insulina hipertróficos tratados con diferentes concentraciones de composiciones mezcla de extractos de rosella y hierbaluisa, en dos proporciones distintas.

45 Figura 4. Gráficos que muestran los niveles de colesterol total, colesterol LDL (malo) y colesterol HDL (bueno) en sangre de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella en proporción 65:35 en peso respectivamente, y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

50 Figura 5. Gráfico y tabla que representan la ratio de eficiencia de la comida en ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de

hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

5 Figura 6. Gráfico que representa el nivel de glucosa en sangre de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

10

Figura 7. Gráfico que representa el nivel de leptina en sangre de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

15

Figura 8. Gráfico que representa el nivel de leptina en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

20

Figura 9. Gráfico que representa el peso de grasa corporal de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

25

Figuras 10a, 10b, 10c y 10d. Gráficos que representan marcadores metabólicos del tejido adiposo abdominal y del hígado de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

30

Figura 11. Gráfico que representa el análisis Western Blot para determinar la cantidad de proteína en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y tratados con los extractos de hierbaluisa y rosella, por separado, y con dos dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella y de ratones alimentados con una dieta alta en grasa no tratados y de ratones alimentados con una dieta normal.

35

Figura 12. Gráficos que representan los genes correspondientes a los marcadores metabólicos de adipocitos humanos inmortalizados, no diferenciados (ND) y diferenciados (MDI), cultivados in vitro tratados con dosis diferentes de los extractos de hierbaluisa (LV) y rosella (HS), por separado, y con dosis diferentes de una mezcla de extractos de hierbaluisa y rosella.

40

45

Figura 13. Gráficos que muestran la disminución en el contenido de lípidos de los adipocitos hipertróficos tratados con la composición con extractos de rosella y hierbaluisa y el aumento paralelo de la activación de AMPK en dichos adipocitos.

5 Figura 14. Esquema del método de producción de un extracto de hierbaluisa.

Figura 15. Esquema del método de producción de la composición de acuerdo con un aspecto de esta invención.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y EJEMPLOS.

**EJEMPLO 1. Determinación de la proporción de extractos de hierbaluisa y rosella.**

15 Se cultivaron preadipocitos 3T3-L1 en placas de 96 pocillos y en medio de cultivo completo (DMEM con glucosa baja a 1g/L) y piruvato de sodio, enriquecido con glutamina y suplementado con suero bovino al 10 % y antibiótico (100 µg/mL de estreptomycin y 100 U/mL de penicilina).

20 La diferenciación de los adipocitos fue inducida añadiendo agentes adipogénicos (0,5 mM IBMX, 1 µM DEX y 1 µM de insulina) al medio de cultivo durante dos días. El medio se cambió por medio fresco cada 48 horas.

25 El cambio fenotípico de los adipocitos se observó con un microscopio. En todos los experimentos, más de un 90 % de las células eran adipocitos maduros tras 8 -10 días de incubación. Para inducir la hipertrofia celular, los adipocitos fueron expuestos a un medio alto en glucosa (25 mM).

30 Los cultivos celulares fueron llevados a cabo en condiciones estériles usando una campana de flujo laminar de aire para cultivos celulares y un incubador a 37 °C con una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

35 Se estudió el efecto de los extractos y el de la composición con ambos extractos sobre la acumulación de triglicéridos y la activación citoplásmica de AMPK en adipocitos 3T3-L1. Los extractos se añadieron después de que los adipocitos se habían diferenciado hasta que las placas fueron analizadas. Los extractos fueron previamente preparados con el medio de cultivo y filtrados con un filtro de 0,2 µm para esterilizarlos.

40 Los adipocitos hipertróficos con 29 días de diferenciación fueron expuestos a extractos de rosella (~10 % en peso antocianinas) y a extractos de hierbaluisa (~30 % en peso fenilpropanoides) por separado y a mezclas de 50:50 en peso y de 35:65 en peso. Los extractos fueron añadidos el día 24 tras la diferenciación de los adipocitos y fueron incubados a 50, 200 y 500 µg/mL durante 5 días.

45 Después de estos cinco días, se evaluó el contenido en lípidos de los adipocitos con el reactivo comercial AdipoRed™ y usando el lector de microplacas multi-modal con captura de imágenes celulares Cytation 3 de BioTek con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 572 nm. La ausencia de citotoxicidad fue evaluada mediante el método del cristal violeta. Los resultados se muestran en la

50

Figura 1, mediante una gráfica representando el porcentaje de acumulación de triglicéridos en adipocitos resistentes a la insulina hipertróficos. HS representa los adipocitos tratados con extracto de rosella con un 10 % de antocianinas, LV representa los adipocitos tratados con extracto de hierbaluisa con un 30 % de fenilpropanoides, HS-LV (1:1) representa los adipocitos tratados con una mezcla de los extractos de hierbaluisa y rosella en proporción uno a uno en peso y HS-LV (35:65) representa los adipocitos tratados con una mezcla de los extractos de hierbaluisa y rosella en proporción 65 a 35 en peso, respectivamente. Los valores de p son: \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001.

Los niveles de AMPK y de AMPK fosforilado (activado) fueron determinados mediante un experimento de inmunofluorescencia cuantitativa usando los anticuerpos de AMPK y AMPK fosforilado. Además, los núcleos fueron marcados con el reactivo Hoechst 33342. Una vez que las células fueron marcadas, la fluorescencia del AMPK fue cuantificada con una longitud de onda de excitación de 490 nm y de emisión de 520 nm, la del AMPK fosforilado con una longitud de onda de excitación de 593 nm y de emisión de 614 nm y la de los núcleos con una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 461 nm, usando el lector de microplacas multi-modal.

Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3 que muestran gráficos que representan porcentajes de activación de AMPK en adipocitos resistentes a la insulina hipertróficos tratados con diferentes dosis de los extractos de rosella y hierbaluisa por separado y en combinación en dos proporciones distintas. Se puede observar que la mayor activación de AMPK se produce con la mayor dosis de la composición que contiene los dos extractos en una proporción de 35 a 65 en peso de extracto de rosella a extracto de hierbaluisa, respectivamente. Los valores de p son: \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001, que indican diferencias estadísticamente significativas con los adipocitos de control (adipocitos no tratados). Las leyendas tienen el mismo significado que en la Figura 1.

## **EJEMPLO 2. Evaluación de la reducción en grasa, hiperlipemia, hiperglicemia y adipogénesis en ratones obesos tratados con una composición que contiene extractos de hierbaluisa y rosella.**

Los experimentos in vivo se realizaron en ratones normales a los que se les dieron una dieta alta en grasas (High Fat Diet, HFD) durante 8 semanas. Se analizaron los niveles de colesterol total en sangre, así como de HDL (colesterol bueno o lipoproteína de alta densidad) y LDL (colesterol malo o lipoproteína de baja densidad).

Los resultados se muestran en la Figura 4 en donde C57bl/6-Nr corresponde a ratones con dieta normal, HFD-CTL a ratones con dieta alta en grasa (HFD), HFD-LV a ratones con dieta alta en grasa y tomando extracto de hierbaluisa con ~30% en peso de fenilpropanoides, HFD-HS a ratones con dieta alta en grasa y tomando extracto de rosella con ~10% en peso de antocianinas, y HFD-MetA a ratones tomando la composición con ambos extractos en proporción 65:35, respectivamente.

Los resultados demuestran que los ratones tomando la composición con ambos extractos tenían niveles más bajos de colesterol total, coincidiendo con una bajada de LDL y una subida de HDL. Estos valores eran más bajos que con los extractos ingeridos por separado (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  con respecto al control HFD-CTL).

5

Se analizó la cantidad de comida que los ratones tomaban al día, con respecto al peso del animal. Este valor se conoce como el cociente de eficiencia de comida (Food Efficiency Ratio). Una cantidad más baja implica una ingesta menor de comida con respecto a su peso. Los resultados se pueden observar en la Figura 5. (\*  $p < 0,01$  con respecto al control HFD-CTL)

10

También se analizó el nivel de glucosa en sangre, ya que los ratones con dieta alta en grasa son hiperglucémicos. Como se puede ver en la Figura 6 (\*  $p < 0,05$  con respecto al control HFD-CTL), los ratones que tomaban la concentración más alta de la composición con ambos extractos eran los únicos con una reducción importante de glucosa en sangre, cerca de los niveles de ratones con dieta normal.

15

Se analizaron los niveles de la hormona leptina en los ratones tomando una dieta alta en grasa. Concretamente, se analizaron los niveles de dichas hormonas en sangre, como se puede ver en la Figura 7 (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  con respecto al HFD-CTL).

20

Comparando el control con dieta normal (C57bl/6J Nr) con respecto al que está tomando una dieta alta en grasa (HFD-CTL), podemos comprobar que la leptina tiene una expresión significativamente mayor en el caso de la dieta alta en grasa. La leptina induce la saciedad, sin embargo, se sabe que los receptores de membrana de dicha hormona tienen una resistencia elevada en individuos obesos, y requieren de niveles altos de leptina para que se estimulen y por tanto activen la cascada de señales que induzcan la saciedad. Como consecuencia, detectar niveles elevados de leptina en los ratones con dieta alta en grasa, y consiguientemente obesos, confirma dicha resistencia a la hormona.

25

30

La toma de cualquiera de los extractos o mezclas probadas (hierbaluisa, rosella, combinación o mezcla) disminuye la expresión de leptina en sangre, aunque solo en el caso de la composición con ambos extractos podemos ver unos valores similares a los detectados en ratones con dieta normal, es decir, no obesos. Por tanto, la toma de esta composición es capaz de revertir esta sobreexpresión de leptina, ya que anula la resistencia a dicha hormona, permitiendo de esta forma que los ratones tengan niveles de saciedad parecidos a las normales.

35

40

Este dato coincide con los resultados observados con el FER (Food Efficiency Ratio), donde los ratones que tomaron la composición con ambos extractos ingerían menos cantidad de alimento con respecto a su peso.

45

Un resultado similar se puede observar en la Figura 8 en cuanto a la expresión de leptina en el tejido adiposo, donde se puede comprobar que solo en los ratones que tomaban la composición con ambos extractos disminuían su expresión de leptina en el tejido adiposo (\* $p < 0,05$  vs HFD-CTL), llegando a los niveles observados en los ratones con dieta normal. Esto es debido a una posible sensibilización de los receptores de leptina en los ratones que tomaban la composición con ambos

50

extractos, de forma que una menor concentración de leptina en sangre es suficiente para producir la sensación de saciedad.

5 Se ha estudiado el efecto de los extractos de hierbaluisa y de rosella por separado y combinados en la composición objeto de la invención en el metabolismo del tejido adiposo. En primer lugar, se comprobó la cantidad de tejido adiposo que tenían los ratones, aislando y pesando la grasa del abdomen, epidídimo, riñón e intestino.

10 Como se puede apreciar en la Figura 9, solo los ratones que tomaban la composición con ambos extractos presentaban significativamente menos cantidad de grasa, en el caso del abdominal, epididimal, e intestino (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Estos valores concuerdan con los resultados comentados anteriormente, es decir, que los ratones toman menos alimento, mediante la regulación de la saciedad, que resulta en la disminución de peso mediante pérdida de tejido adiposo.

15 Además del peso, se estudiaron marcadores metabólicos en el tejido adiposo abdominal y el hígado (debido a en el caso de sobrepeso/obesidad hay una acumulación anómala de tejido adiposo en el hígado, denominado "hígado graso") relacionados con la regulación de la acumulación o producción de triglicéridos y  
20 ácidos grasos. Los marcadores analizados, mediante RT-PCR, fueron PPAR $\gamma$ , SREBP1c (ADD1), C/EBP $\alpha$  y AMPK.

25 PPAR $\gamma$  es un receptor de membrana nuclear que se encuentra en adipocitos, así como células del colon y macrófagos. En el caso del tejido adiposo, su función es en activar la lipogénesis y captación de lípidos. SREBP1c regula la homeostasis de los lípidos, y su activación induce a la síntesis de colesterol cuando éste sea bajo. C/EBP $\alpha$  es un factor de transcripción que regula tanto la adipogénesis como la función normal de adipocitos, y regula la expresión de PPAR $\gamma$ . Finalmente, la AMPK (AMP quinasa) inhibe la captación de lípidos, síntesis de colesterol y lipogénesis,  
30 entre otras funciones, aunque para realizar su función la proteína debe estar fosforilada (p-AMPK).

35 Como se puede apreciar en los histogramas de las Figuras 10a a 10d, la expresión de PPAR $\gamma$  y SREBP1c (ADD1) disminuye significativamente únicamente en los ratones que tomaron la composición con ambos extractos, estudiado tanto en el hígado como en el tejido adiposo abdominal (\* $p < 0,05$ ). En cuanto al C/EBP $\alpha$ , también se ve un efecto de disminución en su expresión con hierbaluisa y rosella, pero solo en el hígado, mientras que la composición con ambos extractos disminuía la expresión de este factor de transcripción en ambos tejidos analizados. En estos  
40 tres genes, la expresión resultante en los ratones tomando la composición con ambos extractos era similar a la obtenida en los ratones control que tomaban una dieta normal.

45 Por otro lado, la expresión transcripcional de AMPK se encontraba aumentada en los ratones tomando la composición con ambos extractos (en el hígado, los ratones tomando rosella también apreciaban un aumento de su expresión, pero no en el tejido adiposo).

50 Este resultado además se corroboró mediante un análisis Western Blot, que permite analizar la cantidad de proteína presente en el tejido adiposo y cuyos resultados se

muestran en la Figura 11. La leyenda se interpreta como: N ratones con dieta normal, CT ratones con dieta alta en grasa sin tratar, LV ratones con dieta alta engrasa tratados con extracto de hierbaluisa, HS ratones con dieta alta engrasa tratados con extracto de rosella, MA1 ratones con dieta alta engrasa tratados con mezcla 35:65 de extractos de rosella y hierbaluisa a una dosis de 50 mg/kg y MA2 ratones con dieta alta engrasa tratados con mezcla 35:65 de extractos de rosella y hierbaluisa a una dosis de 100 mg/kg.

La forma activa de la AMPK es cuando está fosforilada (p-AMPK). Como se puede ver en la figura, el tejido adiposo de los ratones tomando la composición con ambos extractos eran los que presentaban mayor concentración de p-AMPK en forma de proteína activa.

Por tanto, los ratones tomando una dieta alta en grasas durante 8 semanas (HFD-CTL) presentan una activación de genes implicados en la acumulación de grasa, lipogénesis, síntesis de triglicéridos y colesterol, y de adipogénesis, lo cual da lugar a un mayor contenido de grasa corporal, comparando con ratones control con una dieta normal (C57bl/6J Nr). Sin embargo, cuando estos ratones toman la composición con ambos extractos, se revierte la expresión de estos genes, hacia concentraciones parecidas a las observadas en ratones no obesos con dieta normal. Además, la activación de p-AMPK indica que aumenta el metabolismo de ácidos grasos, disminuyendo su almacenamiento a la vez que aumenta su degradación.

Estos resultados in vivo realizados en ratones se corroboraron con estudios in vitro empleando una línea celular de adipocitos humanos, donde se probaron distintas concentraciones de los diversos ingredientes y se cultivaron durante 10 días. Se analizaron los mismos genes que los estudiados en ratones para el metabolismo de ácidos grasos. Los resultados se muestran en la Figura 12. (ND: cultivos celulares sin diferenciar, MDI: cultivos celulares diferenciados, LV: hierba luisa, HB: rosella, MA: composición con ambos extractos, 125-1000: concentraciones de los ingredientes, expresados en µg/ml).

En los casos de PPAR $\gamma$ , SREBP1c(ADD1), C/EBP $\alpha$ , se observa una disminución de su expresión en los tres casos estudiados con respecto a los adipocitos diferenciados (MDI), concretamente en la concentración de 1 mg/ml de hierbaluisa, de rosella, y tanto 0.5 como 1 mg/ml de la composición con ambos extractos. Por tanto, la composición con ambos extractos se puede emplear a concentraciones más bajas para inducir un efecto represor de dichos transcritos, comparado con los extractos de forma individual.

En cuanto a la AMPK, se puede observar un importante aumento de expresión en el caso de la composición con ambos extractos a 0.5 y 1 mg/ml, mientras que con los extractos por separado, no se aprecian diferencias significativas con respecto al cultivo celular diferenciado (MDI).

**EJEMPLO 3. Reducción de apetito y/o incremento de la saciedad mediante cambios en péptidos segregados por el tubo digestivo y tejido adiposo inducidos por consumo de composición que contiene un extracto de hierbaluisa con un contenido de 30 % en peso de fenilpropanoides y un**

**extracto de rosella con un contenido de 10 % en peso de antocianinas, en una proporción de 65 a 35 en peso.**

5 Se seleccionaron 54 mujeres de edades comprendidas entre 30 y 75 años con un índice de masa corporal entre 25 a 35 kg/m<sup>2</sup>. El estudio es un ensayo de 8 semanas, aleatorio, doble ciego, con control placebo llevado a cabo en la Universidad Miguel Hernández de Elche en España. Tras el alistamiento, las voluntarias fueron aleatoriamente asignadas al grupo de control por placebo L2 (n=26) o al grupo experimental L1 (n=28).

10 Los miembros del grupo L1 (edad media 51 años) recibieron una dosis diaria de 500 mg de una composición que contiene extracto de hierbaluisa y extracto de rosella.

15 Los miembros del grupo L2 (edad media 51 años) recibieron una dosis diaria de 500 mg de celulosa microcristalina.

20 Las capsulas de placebo y de la composición de efecto saciante tenían el mismo tamaño, olor, color y peso. Los voluntarios tomaron una capsula 20 o 30 minutos antes del desayuno cada día durante dos meses.

Se requirió a las voluntarias seguir una dieta isocalórica equilibrada y caminar durante al menos 30 minutos al día.

25 El cumplimiento de estos requisitos fue monitorizado durante las visitas clínicas o por entrevistas telefónicas cada semana. Un total de 3 y 4 participantes fueron excluidas de los grupos L2 y L1 respectivamente.

30 Durante el estudio se monitorizaron varios parámetros. Se tomaron las medidas antropométricas al inicio del estudio, después de un mes y tras dos meses desde el inicio del estudio, que incluyen peso corporal, altura, medida de los pliegues cutáneos del tríceps, bíceps y abdominal y medida del perímetro del brazo y del abdomen. El perímetro del abdomen (AC) se midió en dos sitios diferentes: por delante a medio camino entre el abultamiento xifoideo del esternón y el ombligo y lateralmente a medio camino entre el final de la caja torácica y las crestas ilíacas (AC1) y a la altura del ombligo (AC2). El porcentaje de grasa corporal fue obtenido a partir de las medidas abdominales mediante la ecuación de Weltman. Además también se midió la tensión sistólica y diastólica y el ritmo cardiaco en reposo al inicio, tras un mes y tras dos meses de estudio.

40 La escala visual análoga (test VAS) validada fue utilizada para registrar el hambre, la saciedad, el sentimiento de llenado, el consumo de comida prospectivo, deseo de comer algo graso, salado, dulce o no dulce y la apreciación del sabor de las comidas. El test VAS fue completado al inicio del estudio en reposo y tras 15, 20, 45 y 60 días de estudio. De forma complementaria a la evaluación subjetiva del estado de salud, las voluntarias rellenaron un cuestionario SF-36 al comienzo y al final del estudio. Finalmente, se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena del antebrazo tras ayuno nocturno al principio, tras 30 y tras 60 días de estudio. El plasma fue procesado inmediatamente y las muestras se almacenaron a -80 grados Celsius.

La tabla 1 muestra los parámetros antropométricos al inicio y durante el estudio. No se observan diferencias significativas al principio del estudio entre ambos grupos. Los resultados de la tabla 1 indican una mejora estadísticamente significativa de los parámetros antropométricos tras dos meses de estudio en el grupo (L1) que tomó la composición con extractos de hierbaluisa y rosella, especialmente se mejoraron el porcentaje de grasa corporal, el pliegue cutáneo del tríceps, el peso corporal y el perímetro de la cadera (AC2). Estas diferencias se pueden observar con más claridad en la tabla 1a.

Parámetros antropométricos	Grupo L2			Grupo L1		
	Inicio	Mes 1	Mes 2	Inicio	Mes 1	Mes 2
Peso corporal (kg)	75.64 ± 12.92	74.20 ± 12.62****	73.56 ± 12.57****	75.26 ± 9.06	72.80 ± 9.45****	71.78 ± 9.06****
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	29.78 ± 4.19	29.15 ± 4.08****	28.95 ± 4.01****	29.60 ± 3.40	28.60 ± 3.52****	28.26 ± 3.46****
Perímetro del brazo (cm)	31.20 ± 3.80	31.23 ± 3.80	30.98 ± 4.10	30.58 ± 1.67	30.47 ± 1.83	30.26 ± 1.76****
AC1 (cm)	94.02 ± 13.03	92.84 ± 12.86***	92.05 ± 13.16****	90.96 ± 9.03	88.96 ± 9.18****	88.01 ± 8.90****
AC2 (cm)	100.7 ± 14.01	100.5 ± 14.21	99.90 ± 14.54**	96.42 ± 7.93	94.84 ± 7.87****	93.85 ± 7.95****
Perímetro de la cadera (cm)	108.8 ± 8.73	108.15 ± 8.55**	107.5 ± 8.48***	110.4 ± 7.23	108.2 ± 7.56****	106.9 ± 7.48****
Pliegue cutáneo del tríceps (mm)	43.25 ± 9.28	43.15 ± 9.34	43.10 ± 9.42	41.62 ± 8.18	40.96 ± 8.08**	39.98 ± 7.97****
Pliegue cutáneo del bíceps (mm)	41.53 ± 14.46	41.25 ± 14.35*	41.09 ± 14.35*	38.33 ± 10.63	37.61 ± 10.87*	36.87 ± 10.52****
Pliegue cutáneo abdominal (mm)	35.72 ± 11.15	35.39 ± 10.68	34.39 ± 10.68	41.45 ± 12.89	39.72 ± 12.95***	38.60 ± 13.08***
% grasa corporal	44.98 ± 2.71	44.69 ± 2.65***	44.53 ± 2.64****	44.66 ± 2.04	44.10 ± 2.10****	43.83 ± 2.06****
<b>Constantes vitales</b>						
Ritmo cardiaco (bpm)	71.41 ± 8.89	71.95 ± 8.85	72.09 ± 9.24	73.32 ± 9.70	70.84 ± 7.54*	68.64 ± 7.07****
Tensión sistólica (mmHg)	114.5 ± 23.26	115.1 ± 23.55*	115.2 ± 23.13*	117.4 ± 12.13	115.1 ± 12.82**	113.9 ± 12.5****
Tensión diastólica (mmHg)	73.73 ± 10.57	74.05 ± 11.50	73.73 ± 10.70	73.40 ± 5.00	71.28 ± 5.89****	69.48 ± 6.62****

**Tabla 1.** Cambios en los parámetros antropométricos durante el estudio expresados en valores medios más/menos desviaciones estándar. El análisis estadístico intra-grupo fue determinado en cada periodo en comparación con los datos al inicio del estudio. La significatividad fue establecida a: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Parámetros antropométricos	Diferencias tras 1 mes		Diferencias tras 2 meses	
	Placebo (L2, n= 22)	MetabolAid® (L1, n= 25)	Placebo (L2, n= 22)	MetabolAid® (L1, n= 25)
Peso corporal (kg)	-1.44 ± 0.27	-2.46 ± 0.28*	-2.08 ± 0.30	-3.48 ± 0.40*
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	-0.63 ± 0.14	-1.00 ± 0.15*	-0,83 ± 0.12	-1,37 ± 0,16*
Perímetro del brazo (cm)	0.03±0.03	-0.11±0.06	-0.22 ± 0.23	-0.32 ± 0.08**
AC1 (cm)	1.18±0.29	-2.00±0.27*	-1.97 ± 0.37	-2.95 ± 0.36
AC2 (cm)	0.20±0.54	-1.58±0.25**	-0.80 ± 0.55	-2.57 ± 0.34**
Perímetro de la cadera(cm)	0.65±0.23	-2.20±0.32***	-1.30 ± 0.28	-3.50 ± 0.37****
Pliegue cutáneo del tríceps (mm)	-0.10 ± 0.16	-0.66±0.18*	-0.15 ± 0.15	-1.64 ± 0.29****
Pliegue cutáneo del bíceps (mm)	-0.28±0.14	-0.62±0.22	-0.44 ± 0.19	-1.46 ± 0.29**
Pliegue cutáneo abdominal (mm)	-0.33±0.36	-1.73±0.37*	-1.33 ± 0.29	-2.84 ± 0.53*
% Grasa Corporal	0.29±0.06	-0.56±0.06**	-0.45 ± 0.07	-0.83 ± 0.08***
Pulso cardíaco (lpm)	0.54 ± 0.28	-2.48 ± 0.89****	0.68 ± 0.36	-4.68 ± 0.36****
Presión sistólica (mmHg)	0.60 ± 0.28	-2.30 ± 0.64****	0.70 ± 0.30	-3.50 ± 0.61****
Presión diastólica (mmHg)	0.32 ± 0.43	-2.12 ± 0.39****	0 ± 0.50	-3.92 ± 0.63****

**Tabla 1a.** Diferencias entre los parámetros antropométricos durante el estudio con los valores iniciales en valores medios más/menos desviaciones estándar. El análisis estadístico intra-grupo fue determinado en cada periodo en comparación con los datos al inicio del estudio. La significatividad fue establecida a: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

5

10

15

De acuerdo con las puntuaciones mostradas en la tabla 2, el consumo de la composición con los extractos de hierbaluisa y rosella disminuye la sensación de hambre consistentemente a lo largo de los dos meses de estudio. La puntuación media de hambre disminuyó de 5.92 en el día 15 a 2.58 en el día 60 en el grupo L1, mientras que en el grupo L2 incrementó de 6.18 en el día 15 a 6.41 en el día 60 en el grupo placebo. Una tendencia similar se observa en las puntuaciones de la pregunta 4.

20

La saciedad incrementó de un valor de 5.04 en el día 15 hasta un valor de 7.58 en el día 60 en el grupo L1, mientras que ésta disminuyó desde un valor de 4.82 en el día 15 hasta un valor de 4.22 en el día 60 en el grupo de placebo L2. Una tendencia similar se observó en la puntuación de la pregunta 3.

Items	15 días		30 días		45 días		60 días	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2
1. Cuánta hambre tienes?	5.92±2.48	6.18±2.36	4.00±2.34**	6.05±1.73	3.29±2.37****	6.18±2.11	2.58±2.35****	6.41±1.87
2. Cómo de saciado te sientes?	5.04±2.07	4.82±1.89	5.92±2.02*	4.32±1.95	6.45±2.32**	4.63±1.50	7.58±1.72****	4.22±1.38
3. Cómo de lleno te sientes?	4.65±1.94	4.45±1.76	5.76±1.80*	4.30±1.90	6.42±1.87****	3.86±1.83	7.46±1.59****	3.52±1.91
4. Cuánto piensas que puedes comer?	5.57±2.83	7.22±1.52	4.14±1.98****	6.95±1.90	2.83±2.20****	6.82±1.74	2.54±1.90****	7.33±1.90
5. Te gustaría comer algo dulce?	2.04±2.23	2.45±2.70	5.65±2.55**	2.80±2.76	4.83±2.73***	1.95±2.13	6.67±2.18****	1.82±2.17
6. Te gustaría comer algo salado?	5.45±3.42	5.09±3.53	6.38±2.73****	2.60±1.79	7.57±2.27****	2.86±2.59	7.75±2.19****	3.09±2.72
7. Te gustaría comer algo no dulce?	2.70±2.25*	4.68±2.93	4.96±2.51	3.68±2.73	6.50±2.19****	2.90±2.75	7.67±1.40****	2.71±2.47
8. Te gustaría comer algo graso?	4.29±3.58** *	8.07±2.52	6.87±3.18	5.60±3.58	8.13±2.71**	5.18±3.88	8.21±2.47**	5.14±3.48

**Tabla 2.** Marcadores de las sensaciones relacionadas con el apetito en el grupo L1 (composición) y el grupo L2 (placebo) tras 15, 30, 45 y 60 días de estudio, expresados como valores medios más/menos la desviaciones estándar. Los datos expresan los marcadores de cada pregunta en comparación con el placebo. Las diferencias estadísticamente significativas fueron establecidas como: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. La puntuación varía según el esquema siguiente:

1. 0 “No tengo nada de hambre” – 10 “Nunca he tenido más hambre”.
2. 0 “Estoy completamente vacía” – 10 “No puedo dar ni un bocado más”
3. 0 “No estoy llena de nada” – 10 “Estoy completamente llena”
4. 0 “Nada de nada” – 10 “Un montón”
5. 0 “Si, mucho” – 10 “No, en absoluto”
6. 0 “Si, mucho” – 10- “No, en absoluto”
7. 0 “Si, mucho” – 10- “No, en absoluto”
8. 0 “Si, mucho” – 10- “No, en absoluto”

	Placebo (L2, n= 10)		Composición con extractos (L1, n= 10)	
	INICIO	MES 2	INICIO	MES 2
<b>GLP-1</b> (pg/mL)	5,66 ± 1,27	4,228 ± 2,04*	5,22 ± 1,43	6,82 ± 1,78*
<b>GHRELINA</b> (pg/mL)	30,64 ± 0,64	33,74 ± 3,48*	32,70 ± 4,82	32,89 ± 3,23
<b>LEPTINA</b> (pg/mL)	9669 ± 6617	5237 ± 4886	9772 ± 4455	4311 ± 2304*
<b>PYY</b> (pg/mL)	7,84 ± 4,15	5,82 ± 5,01	9,80 ± 0,31	9,81 ± 0,24
<b>RESISTINA</b> (pg/mL)	15593 ± 6718	10799 ± 6624	18101 ± 6274	12049 ± 4022*

5 **Tabla 3.** Niveles de péptidos en sangre segregados por el tracto digestivo relacionados con el apetito y la saciedad determinados al inicio y al final del estudio (segundo mes), expresados como valores medios más/menos las desviaciones estándar. La significatividad se estableció para: \*p<0,05.

10 Es necesario mencionar que algunos péptidos analizados (como el GLP-1, PYY y ghrelina) son secretados tras la ingesta de alimentos. La ghrelina estimula el apetito, mientras que GLP-1 y PYY se secretan juntos para provocar la sensación de saciedad. Debido a que las muestras de sangre fueron tomadas en ayunas por la mañana, los niveles determinados de estos péptidos en particular, se corresponden con niveles basales. Inicialmente, los niveles basales de ambos grupos coinciden y no se aprecian diferencias significativas entre ambos. Los otros péptidos presentan diferencias significativas en el grupo L1. En este contexto, la incretina GLP-1 aumentó significativamente en el grupo L1 mientras que disminuyó en el grupo L2 y la ghrelina aumentó en el grupo L2 y se mantuvo constante en el grupo L1. Por lo tanto, los voluntarios del grupo L1 tenían menos apetito y más sensación de saciedad que los voluntarios del grupo L2.

25 Por otra parte, la leptina, que se sintetiza en el tejido adiposo y produce sensación de saciedad, disminuyó significativamente en el grupo L1 mientras que no se apreciaron cambios en el grupo L2. La resistina decreció significativamente en el grupo L1 mientras que no se observaron cambios en el grupo L2. El nivel elevado de leptina en sangre en el grupo L2 se explica por la resistencia creada en los receptores correspondientes a provocar saciedad en respuesta a la secreción de leptina, es como si los receptores correspondientes se hubieran insensibilizado, mientras que en el grupo L1 el nivel normal de leptina en sangre indica que los receptores correspondientes siguen con la misma sensibilidad o mayor al nivel de leptina.

35 En general, estos cambios en los niveles de hormonas (péptidos) se correlacionan positivamente con las puntuaciones de los cuestionarios sobre apetito y saciedad y con la evolución de los parámetros antropométricos mostrados anteriormente.

**EJEMPLO 4. Reducción de peso corporal mediante una modificación en el metabolismo de lípidos mediada por una activación de los sensores energéticos de proteína quinasa activados por AMP (AMPK).**

La acumulación de triglicéridos y la activación de AMPK por los polifenoles fue evaluada mediante inmunofluorescencia con el modelo de adipocito 3T3-L1 resistente a la insulina hipertrofico. Por otra parte, se realizó un estudio clínico con voluntarios tomando un placebo o 500 mg al día de un suplemento dietético con extractos de hierbaluisa y rosella en proporción 65:35 respectivamente, doble ciego con control de placebo y aleatorio en el que participaron 56 voluntarios con sobrepeso durante dos meses. Se determinaron parámetros antropométricos y parámetros bioquímicos.

Los preadipocitos 3T3-L1 fueron cultivados en un medio bajo en glucosa (1g/L) DMEM suplementado con 10 % de suero bovino (CS), 100 µg/mL de estreptomocina y 100 U/mL de penicilina y fueron incubados a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire en volumen. La diferenciación a adipocitos fue inducida mediante cultivo en un medio alto en glucosa (4.5g/L) DMEM suplementado con 10% en suero fetal bovino (FBS), 1 µM de insulina, 1 µM de dexametasona (DEX) y 0.5 mM de 3 isobutil-1-metilxantina (IBMX) durante 48 horas. Tras las 48 horas, las células se mantuvieron en un medio alto en glucosa con FBS e insulina, y el medio fue cambiado cada dos días, con lo que se obtuvieron adipocitos hipertrofiados tras 20 días de incubación. Una vez que los adipocitos hipertrofiados fueron obtenidos, las células fueron tratadas con extractos de hierbaluisa (~ 30 % en peso de fenilpropanoides) y de rosella (~10 % en peso de antocianinas) en proporción en peso de 65 a 36, a varias concentraciones durante 72 horas. Los extractos fueron disueltos en un medio y filtrados para ser esterilizados.

El contenido en lípidos de los adipocitos hipertroficos fue evaluado usando el reactivo AdipoRed™. Se eliminó el sobrenadante de las células y éstas fueron lavadas cuidadosamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, se añadió AdipoRed™ y se dejó incubar las células durante 15 a temperatura ambiente. La acumulación de triglicéridos fue medida usando un lector de microplacas a 485 nm longitud de onda de excitación y a 572 nm de emisión.

Para el estudio de la activación de AMPK en adipocitos hipertrofiados, se cuantificó el AMPK fosforilado en Thr172 (pAMPK) con una ensayo de inmunofluorescencia. Las células fueron fijadas con un tampón de fijación, permeabilizadas con 0.3% de Triton x-100 (Sigma-Aldrich, España) y bloqueadas con 4% de suero de cabra. Una vez hecho esto, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con AMPK anticuerpos monoclonales de ratón alpha 1 + alpha 2 (Abcam, Cambridge, UK) y con fosfo-AMPK alpha 1 de conejo (Thr172; Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA). Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 6 horas a temperatura ambiente con cada anticuerpo policlonal secundario correspondiente, IgG CF™ 594 de cabra anti-conejo y FITC anti-ratón (ambos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La fluorescencia de las células fue medida utilizando un lector de microplacas multi-

modo con captura de imágenes celulares (Cytation 3, Biotek, España) a 593 nm de longitud de onda de excitación y 614 nm de emisión para medir los niveles de AMPK. La activación de AMPK se expresa como el cociente de los niveles de AMPK normalizado por AMPK total. Los resultados se muestran en la Figura 13 (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

El estudio con humanos duró ocho semanas, aleatorio, doble ciego y controlado por placebo. Los criterios de exclusión fueron un nivel de colesterol total menor de 200 mg/dL, la presencia de alguna patología relacionada con la obesidad, el uso de medicación para el colesterol o la hipertensión, el consumo de suplementos o productos farmacéuticos antioxidantes, adicción al alcohol y mujeres embarazadas o en lactancia. Basados en estos criterios se seleccionaron 55 mujeres sanas, de edades entre 36 a 69 años, con un índice de masa corporal de 25 a 34 kg/m<sup>2</sup>, que pasaron una selección y entrevista telefónica sobre su salud así como una evaluación bioquímica y antropométrica.

Una vez alistadas en el estudio, las voluntarias fueron asignadas aleatoriamente al grupo de placebo (n=26) o al grupo experimental (n=29). Durante el estudio se retiraron 9 voluntarias, 6 en el grupo de placebo y 3 en el grupo experimental, y un total de 46 voluntarias completó el estudio. El grupo de placebo (edad media 51 años) recibió dos cápsulas de placebo con 400 mg de celulosa microcristalina cada una y el grupo experimental (edad media 52) recibió dos capsulas que contenían cada una 250 mg de la composición con extractos de rosella y hierbaluisa y 150 mg de excipientes (celulosa microcristalina). Por lo tanto, el grupo experimental tomaba 500 mg/día de la composición en estudio. Ambos tipos de cápsulas tenían el mismo tamaño, olor, color y peso. Los voluntarios tomaron dos capsulas cada día 20 o 30 minutos antes del desayuno durante dos meses. Durante la visita de selección, se recogió información demográfica y sobre estilo de vida (edad, dieta, pautas de ejercicio físico, consumo de alcohol y tabaco). Un médico pidió a las mujeres voluntarias seguir una dieta isocalórica con hidratación normal y caminar al menos 30 minutos al día. Se comprobó el cumplimiento de los requisitos del estudio en cada visita y por teléfono, cada semana, durante los dos meses de estudio. Las medidas de los parámetros se tomaron al inicio del estudio y tras 30 y 60 días de estudio.

Durante el estudio se monitorizaron varios parámetros. Se tomaron las medidas antropométricas al inicio del estudio, después de un mes y tras dos meses desde el inicio del estudio, que incluyen peso corporal, altura, medida de los pliegues cutáneos del tríceps, bíceps y abdominal y medida del perímetro del brazo y del abdomen. El perímetro del abdomen (AC) se midió en dos sitios diferentes: por delante a medio camino entre el abultamiento xifóideo del esternón y el ombligo y lateralmente a medio camino entre el final de la caja torácica y las crestas ilíacas (AC1) y a la altura del ombligo (AC2). El porcentaje de grasa corporal fue obtenido a partir de las medidas abdominales mediante la ecuación de Weltman.

Se tomaron muestras de sangre en ayunas para medir la glucosa total, la hemoglobina glucosilada y el perfil de lípidos, que incluye los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol bueno (lipoproteína de alta densidad) o HDL y el colesterol malo (lipoproteína de baja densidad) o LDL. Las muestras de sangre fueron analizadas para medir parámetros de seguridad como la hematología,

electrolitos, creatinina, urea, ácido úrico, transaminasa glutámica-pirúvica, transaminasa glutámica-oxaloacética y proteína C-reactiva.

Además también se midió la tensión sistólica y diastólica y el ritmo cardiaco en reposo al inicio, tras un mes y tras dos meses de estudio.

	Grupo experimental (N= 26)			Grupo placebo (N= 20)		
	Inicio	Mes 1	Mes	Inicio	Mes 1	Mes 2
<b>Parámetros Antropométricos</b>						
Peso Corporal	75.12 ± 13.62	72.76 ± 13.51***	71.08 ± 13.34***	75.16 ± 11.34	73.36 ± 11.24***	73.12 ± 11.47**
Índice de Grasa Corporal	29.20 ± 4.76	28.26 ± 4.63***	27.59 ± 4.44***	30.23 ± 4.41	29.52 ± 4.42***	29.43 ± 4.58**
AC1 (cm)	90.87 ± 10.81	86.59 ± 9.51***	84.39 ± 9.91***	90.93 ± 13.12	89.21 ± 12.83***	88.50 ± 11.65**
AC2 (cm)	100.52 ± 9.10	97.10 ± 8.20***	94.71 ± 8.94***	102.32 ± 11.59	99.87 ± 11.96**	97.05 ± 10.66***
Grosor pliege triceps	28.36 ± 7.57	26.08 ± 6.95***	24.67 ± 7.42***	30.13 ± 5.24	28.45 ± 4.75**	27.88 ± 4.69***
% Grasa Corporal	44.36 ± 2.86	43.53 ± 2.73***	43.04 ± 2.64***	44.67 ± 2.82	44.18 ± 2.83***	43.95 ± 2.73***
<b>Constantes vitales</b>						
Ritmo cardiaco (pul. por minuto)	79.43 ± 9.84	74.36 ± 9.03***	71 ± 8.40***	75.75 ± 8.62	75.15 ± 11.86	75.50 ± 11.61
Tensión sistólica	128.70 ± 12.74	118.43 ± 13.91***	109.96 ± 9.09***	126.65 ± 19.06	120.70 ± 17.50	118.05 ± 15.64*
Tensión diastólica	77.62 ± 10.99	72.76 ± 10.54*	67.05 ± 9.30***	78.30 ± 13.12	76.10 ± 8.16	71.10 ± 11.61*
<b>Parámetros bioquímicos</b>						
Glucosa mg/dl	93.33 ± 16.10	90.44 ± 14.11	90.06 ± 13.31	93.95 ± 12.96	94.05 ± 11.14	92.63 ± 14.95
Triglicéridos mg/dl	84.83 ± 52.61	76.28 ± 35.22	83.17 ± 39.39	85.63 ± 42.37	78.53 ± 27.95	88.74 ± 39.23
Colesterol total	237.78 ± 26.51	215.22 ± 26.90***	207.94 ± 25.11***	229.11 ± 26.13	205.53 ± 24.84***	207.53 ± 28.62**
HDL mg/dl	60.59 ± 7.24	59.23 ± 7.15	58.95 ± 8.52	59.00 ± 7.54	56.95 ± 9.02*	57.11 ± 8.58*
LDL mg/dl	158.52 ± 25.17	140.90 ± 23.39***	127.43 ± 20.83***	153.68 ± 24.88	132.89 ± 23.18***	132.95 ± 25.39***
Creatinina mg/dl	0.75 ± 0.11	0.85 ± 0.14	0.81 ± 0.12	0.80 ± 0.14	0.91 ± 0.18	0.82 ± 0.12
Urea mg/dl	33.36 ± 7.96	32.09 ± 8.52	32.32 ± 9.15	32.21 ± 10.54	32.37 ± 7.77	31.58 ± 7.44
Ácido úrico mg/dl	4.66 ± 1.01	4.29 ± 1.09	4.55 ± 1.18	4.97 ± 1.53	4.29 ± 1.03	4.48 ± 0.96
GPT U/l	22.59 ± 7.39	21.59 ± 9.53	21 ± 8.83	21.21 ± 6.82	21.61 ± 9.62	20.05 ± 8.44
GOT U/l	21.00 ± 5.07	21.59 ± 5.66	21.27 ± 6.85	21.11 ± 4.53	21.11 ± 5.51	20.21 ± 5.02

**Tabla 4.** Medidas antropométricas, iniciales y tras uno y dos meses de estudio. Los valores estadísticos intra-grupo al final del estudio comparados con los valores

iniciales son: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Los datos son expresados como valores medios  $\pm$  DS.

Según se puede observar en la Figura 13, la composición con extractos de hierbaluisa y rosella causa un potente incremento en el cociente de pAMPK/AMPK de una forma dependiente de la dosis administrada que es estadísticamente significativo en comparación con el incremento observado en el experimento de control a una dosis de 350  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que a una dosis de 500  $\mu\text{g/mL}$  se observa un incremento de 1.5 aproximadamente.

Los parámetros antropométricos de ambos grupos no presentan diferencias apreciables al inicio del estudio. Los resultados del estudio muestran una mejora significativa en el grupo experimental en comparación con el grupo de placebo, tras dos meses de estudio, particularmente en el peso corporal, la circunferencia abdominal y el porcentaje de grasa corporal (ver tabla 4).

El grupo experimental mostro una mayor reducción en peso corporal que el grupo de placebo que es estadísticamente significativa con una  $p < 0.01$ . Ambos perímetros abdominales AC1 y AC2 se redujeron tras los dos meses de estudio, pero solo el perímetro abdominal más elevado mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo de placebo tras uno y dos meses de estudio. En consonancia con estos datos, el porcentaje de grasa corporal redujo en ambos grupos, pero en el grupo experimental se redujo significativamente más que en el grupo de placebo tras los dos meses de estudio,  $p < 0.01$ . También se observaron diferencias estadísticamente significativas en las medidas de pliegues cutáneos del tríceps ( $p < 0.05$ ) y en el índice de masa corporal ( $p < 0.01$ ).

#### **EJEMPLO 5. Método de producción de una composición con extractos de hierbaluisa y rosella de acuerdo con un aspecto de la invención.**

La composición con extractos de hierbaluisa y rosella se trata de una mezcla de dos extractos con una composición de compuestos activos muy específica, es decir, al menos 10% en peso de antocianinas en el extracto de rosella y al menos 30 % en peso de fenilpropanoides en el extracto de hierbaluisa, que mezclados en una relación en peso de 35 a 65, respectivamente, ofrecen actividad sinérgica, especialmente para el control de la saciedad.

El proceso de fabricación del extracto de hierbaluisa comprende una extracción hidroalcohólica empleando concentraciones de alcohol (etanol, metanol, propanol, isopropanol o butanol) superiores al 70 y hasta el 100 % en volumen en agua (Figura 14).

Las hojas de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) se analizan para determinar la cantidad de verbascósido utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se extraen aproximadamente 330 g de hojas de hierbaluisa en 4 litros de etanol diluido en agua desmineralizada (superior al 70 % y hasta el 100% de etanol en volumen) manteniendo agitación del líquido en el recipiente, recirculando el disolvente evaporado o percolándolo en filtro nutcha a una temperatura de 40 a 80 °C durante 2 horas. Al cabo de las dos horas, la disolución se filtra para separar las hojas y

5 otras partículas. La disolución filtrada se destila a vacío a una temperatura de 60 a 80 °C para obtener una disolución acuosa concentrada que contiene de un 15 a 30 % en sólidos. Esta disolución concentrada es secada por atomización (spray-dried) a una temperatura de 70-90 °C para obtener un extracto seco en polvo que contiene no menos de 30 % en peso de fenilpropanoides en total. El rendimiento es de 19 a 21 % en peso.

10 Para producir el extracto de rosella se seleccionan las flores de la planta y se analizan para obtener el contenido en antocianinas mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y detección con luz ultravioleta. Se toman 320 gramos de flores y se extraen con 3.2 litros de etanol diluido en agua desmineralizada al 50 % en volumen, manteniendo la agitación del líquido en el reactor, y recirculando el disolvente evaporado o percolando en filtro nucha a una temperatura entre 40 y 60 °C durante 2 horas. Tras las dos horas de extracción, la disolución se filtra con un 15 filtro de poro de 0.5 micrones para separar las flores. La disolución filtrada se destila a vacío a una temperatura entre 50 y 70 °C y el concentrado obtenido se diluye hasta obtener 620 litros.

20 El producto es sometido a una etapa de purificación por cromatografía en una resina polimérica de adsorción/desorción adecuada para polifenoles. El eluato constituye el extracto purificado en forma líquida. El líquido purificado se concentra hasta un contenido de 30 a 50 % en peso de sólidos. La disolución concentrada se seca por atomización (spray-drying) a una temperatura entre 70 y 80 °C para obtener un 25 extracto seco en polvo que contiene no menos de 10 % de antocianinas. El rendimiento es de 5 a 7 % en peso.

30 Tras la producción de los extractos de hierba luisa y rosella por separado, ambos son tamizados y mezclados y pasan por un sistema de detección de metales antes de ser envasado, como se muestra en el esquema de la Figura 15.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para su uso en la modulación de la ingesta de alimentos de un individuo mediante reducción del apetito y/o aumento de la saciedad a través de una modificación de los niveles de péptidos relacionados con el apetito, caracterizada porque dicha composición comprende un extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas y un extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1 en la que el extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas comprende un extracto con alrededor de un 10 % en peso de antocianinas.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 o 2 en la que el extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides comprende un extracto con alrededor de un 30 % de fenilpropanoides.
- 20 4. Composición según cualquier reivindicación anterior en la que el extracto con antocianinas comprende un extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).
- 25 5. Composición según cualquier reivindicación anterior en la que el extracto con fenilpropanoides comprende un extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*).
- 30 6. Composición según la reivindicación 5 cuando depende de la reivindicación 4 en la que la composición comprende un mínimo de 50% en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y un mínimo de 25 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).
- 35 7. Composición según la reivindicación 6 en la que la composición comprende alrededor de 65% en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y alrededor de 35 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).
- 40 8. Composición según la reivindicación 7 administrada en una dosis de 250 a 1000 mg diarios.
- 45 9. Composición según la reivindicación 8 en la que la dosis administrada es de 500 miligramos diarios.

- 5 10. Composición para su uso en la reducción de peso de un individuo mediante una modificación en el metabolismo de lípidos mediada por una activación de los sensores energéticos de proteína quinasa activados por AMP (AMPK) del individuo que se traduce en una reducción del porcentaje de grasa corporal, caracterizada porque dicha composición comprende un extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas y un extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides.
- 10 11. Composición según la reivindicación 10 en la que el extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas comprende un extracto con alrededor de un 10 % en peso de antocianinas.
- 15 12. Composición según la reivindicación 10 o 11 en la que el extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides comprende un extracto con alrededor de un 30 % de fenilpropanoides.
- 20 13. Composición según cualquier reivindicación de 10 a 12 en la que el extracto con antocianinas comprende un extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).
- 25 14. Composición según cualquier reivindicación de 10 a 13 en la que el extracto con fenilpropanoides comprende un extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*).
- 30 15. Composición según la reivindicación 14 cuando depende de la reivindicación 13 en la que la composición comprende un mínimo de 50% en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y un mínimo de 25 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).
- 35 16. Composición según la reivindicación 15 en la que la composición comprende alrededor de 65% en peso del extracto de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y alrededor de 35 % en peso del extracto de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).
- 40 17. Composición según la reivindicación 16 administrada en una dosis de 250 a 1000 mg diarios.
- 45 18. Composición según la reivindicación 17 en la que la dosis administrada es de 500 miligramos diarios.

- 5 19. Método de producción de una composición que comprende un extracto con al menos un 5 % en peso de antocianinas y un extracto con al menos un 15 % en peso de fenilpropanoides caracterizado porque comprende una extracción hidroalcohólica de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) y una extracción hidroalcohólica de rosella (*Hibiscus sabdariffa*).
- 10 20. Método según la reivindicación 19 en el que la extracción hidroalcohólica de hierbaluisa se efectúa usando una disolución de alcohol en agua con un contenido de alcohol superior al 70% y hasta el 100% en volumen durante dos horas a una temperatura entre 40 y 80 °C.
- 15 21. Método según la reivindicación 20 en el que el contenido en alcohol es alrededor del 70 % en volumen.

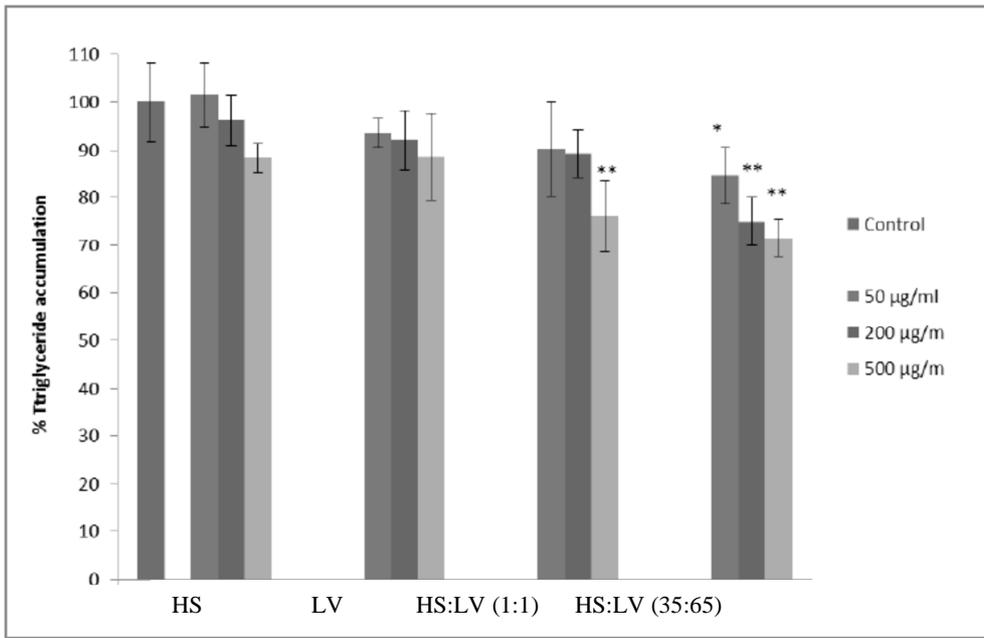


Figura 1

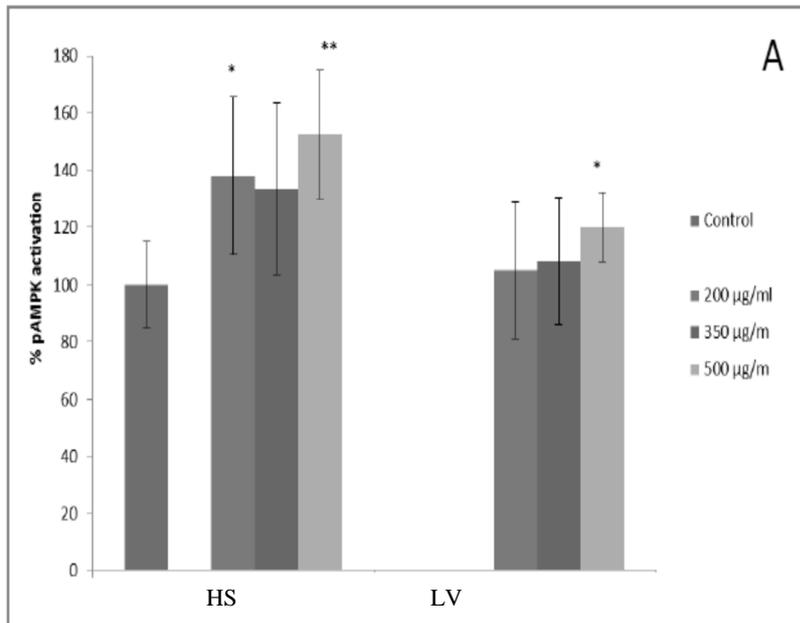


Figura 2

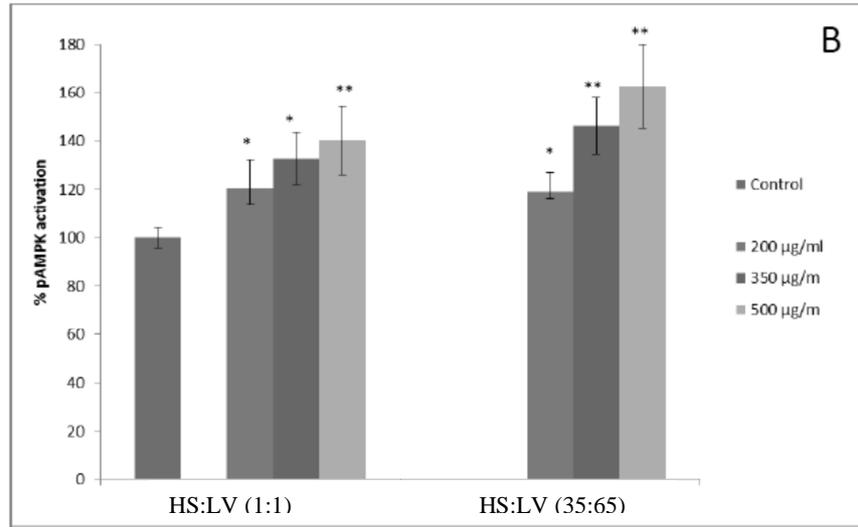


Figura 3

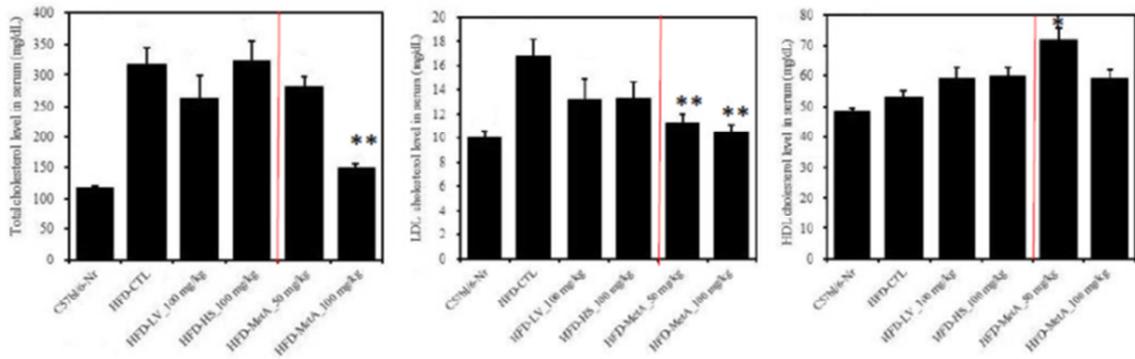
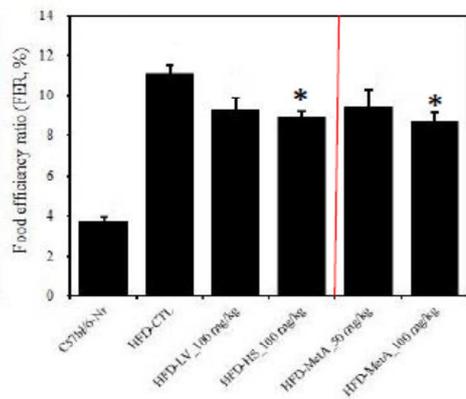


Figura 4



Group	Food efficiency ratio (FER, %)
C57bl/6-Nr	3.73±0.21
HFD-CTL	11.1±0.42
HFD-GK_245 mg/kg	9.40±0.35
HFD-LV_100 mg/kg	9.28±0.60
HFD-HS_100 mg/kg	8.90±0.30*
HFD-MetA_50 mg/kg	9.42±0.88
HFD-MetA_100 mg/kg	8.70±0.41*

Figura 5

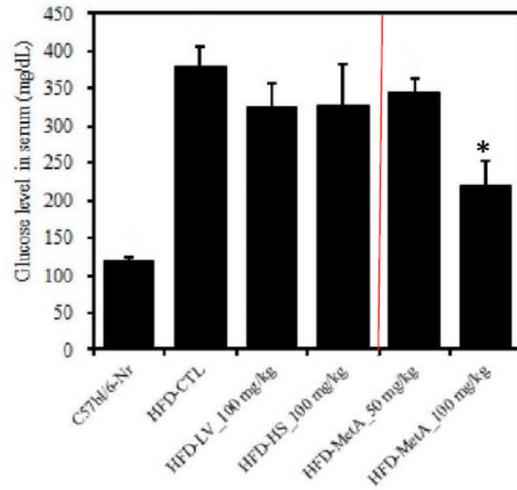


Figura 6

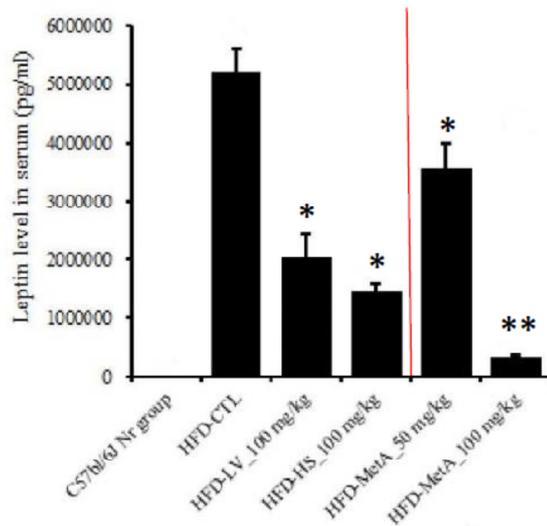


Figura 7

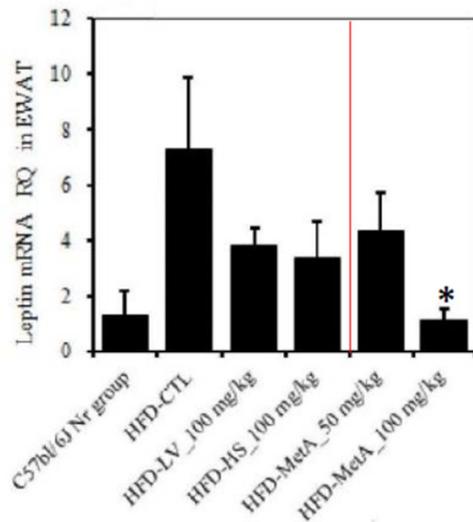


Figura 8

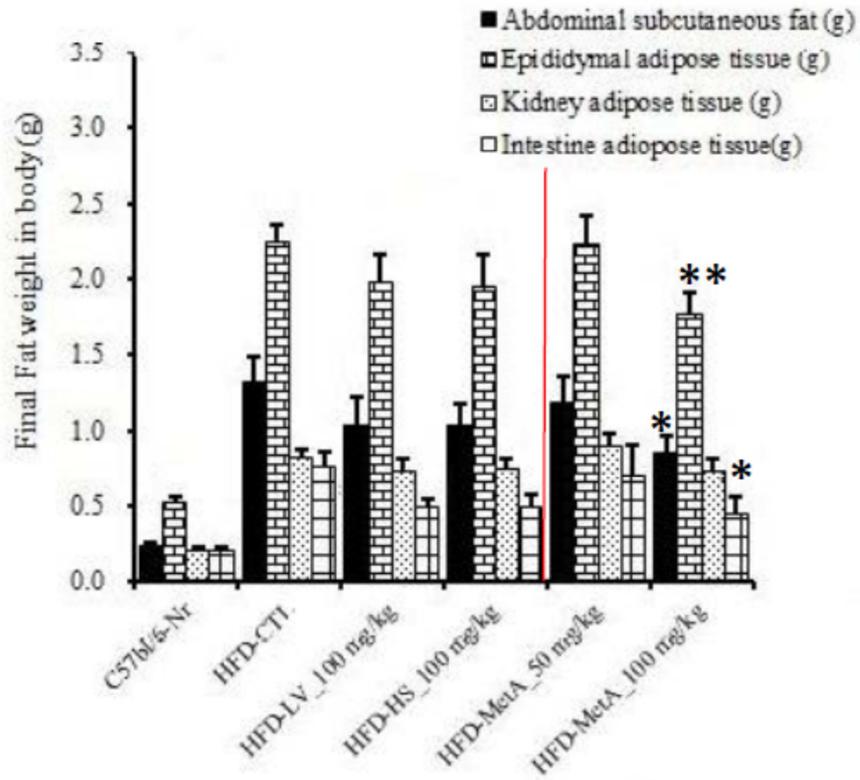


Figura 9

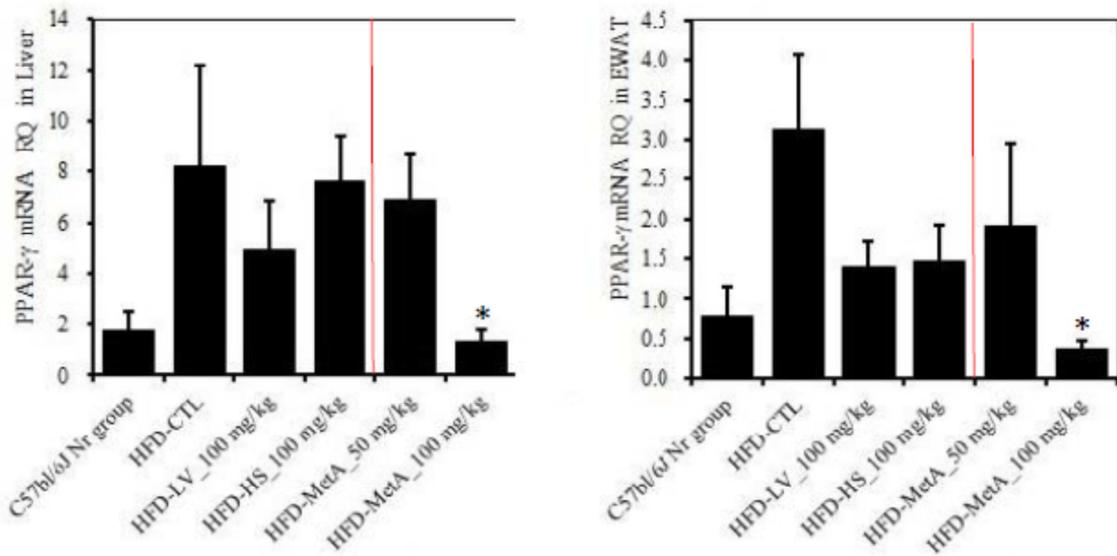


Figura 10a

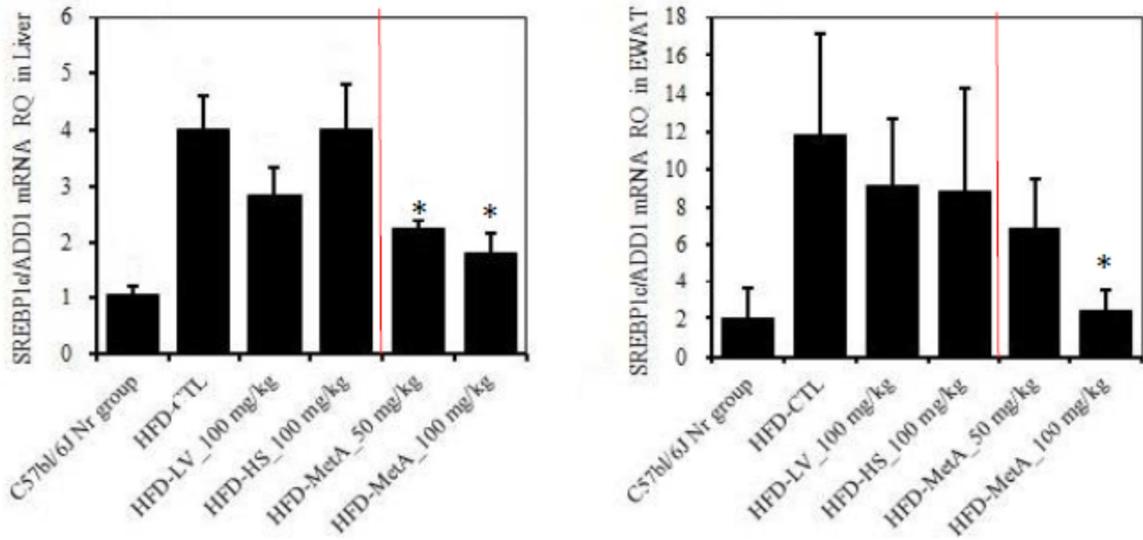


Figura 10b

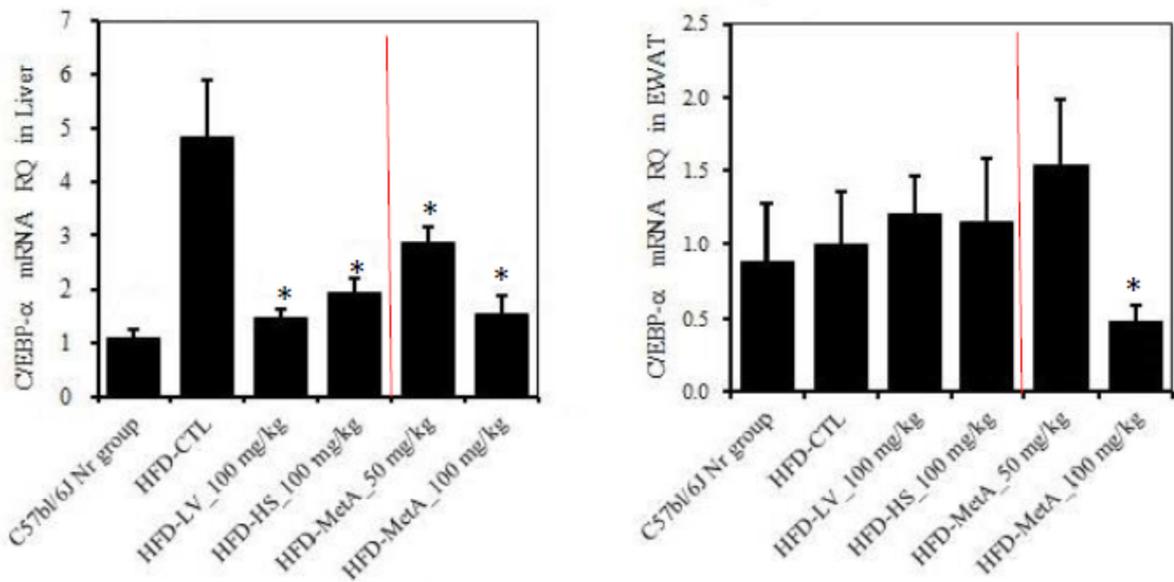


Figura 10c

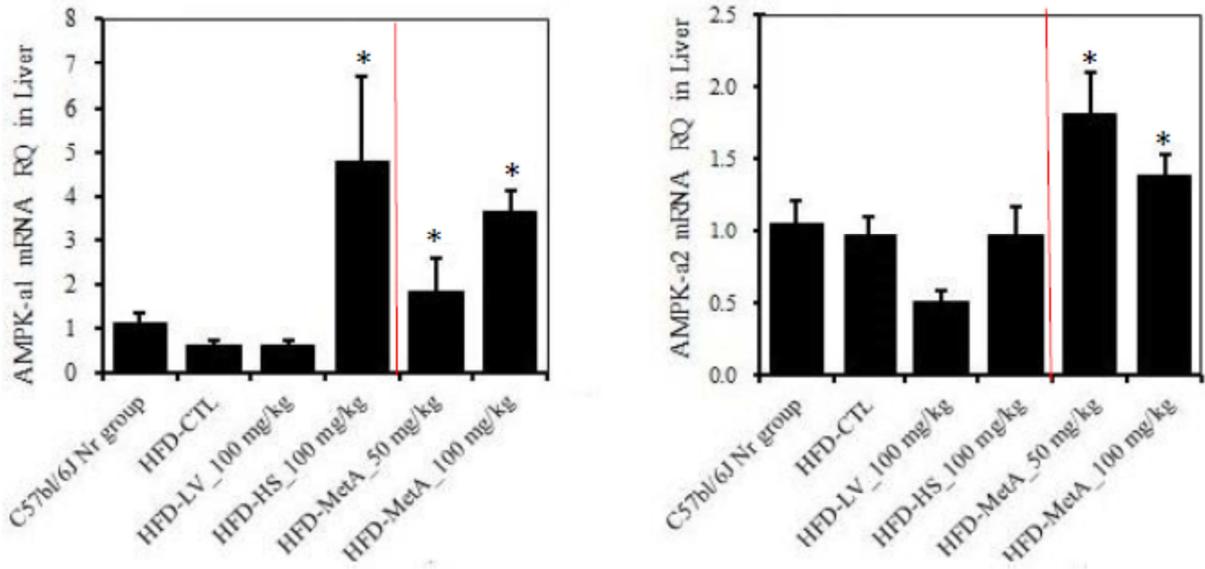


Figure 10d

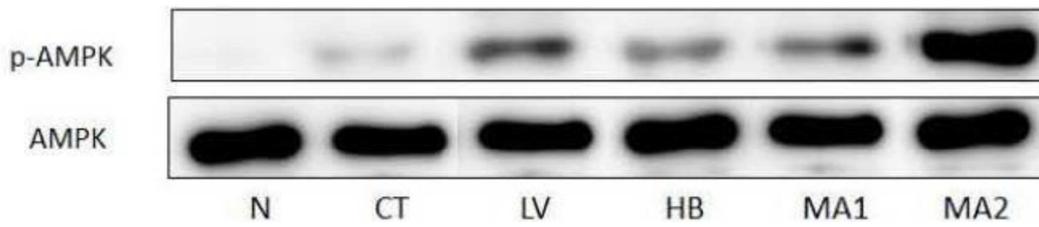


Figure 11

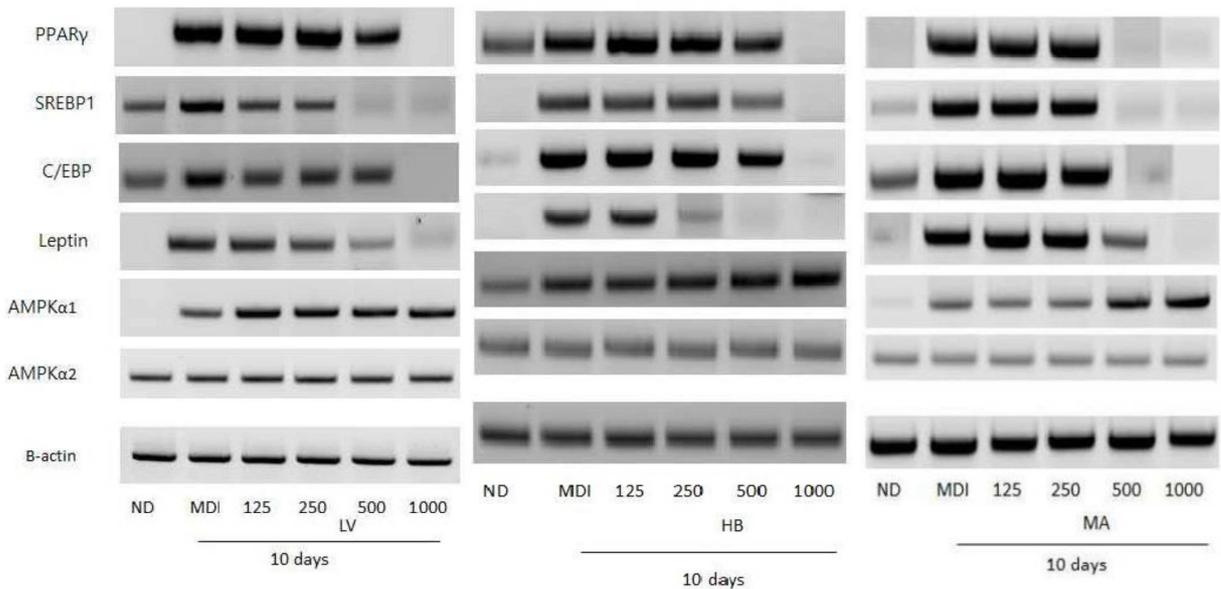


Figure 12

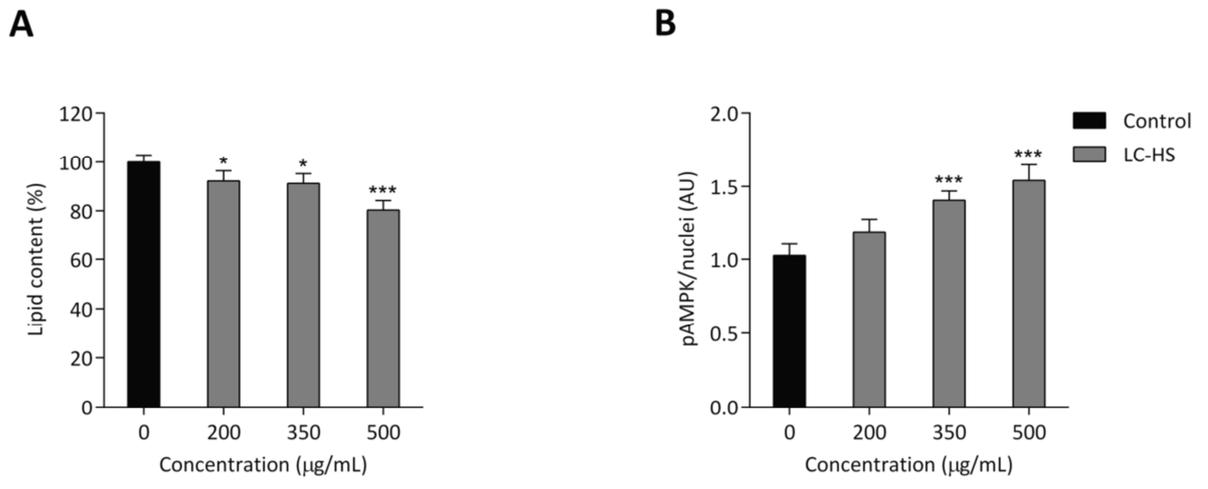


Figura 13

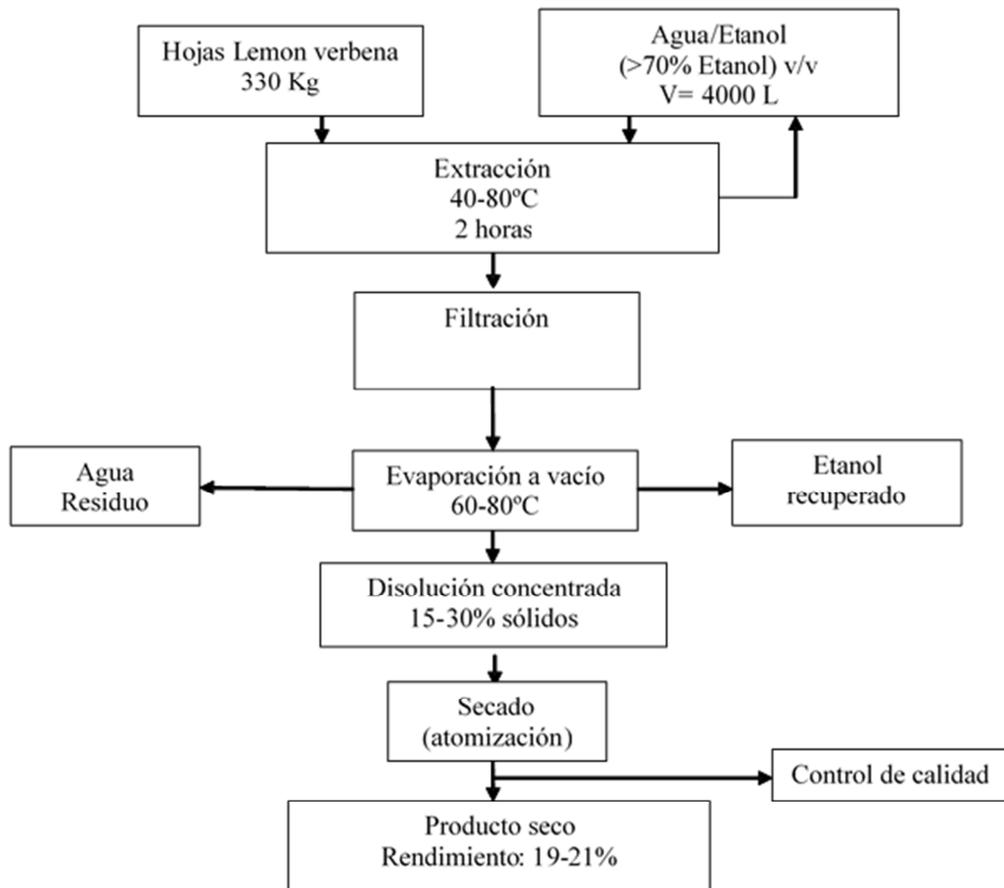


Figura 14

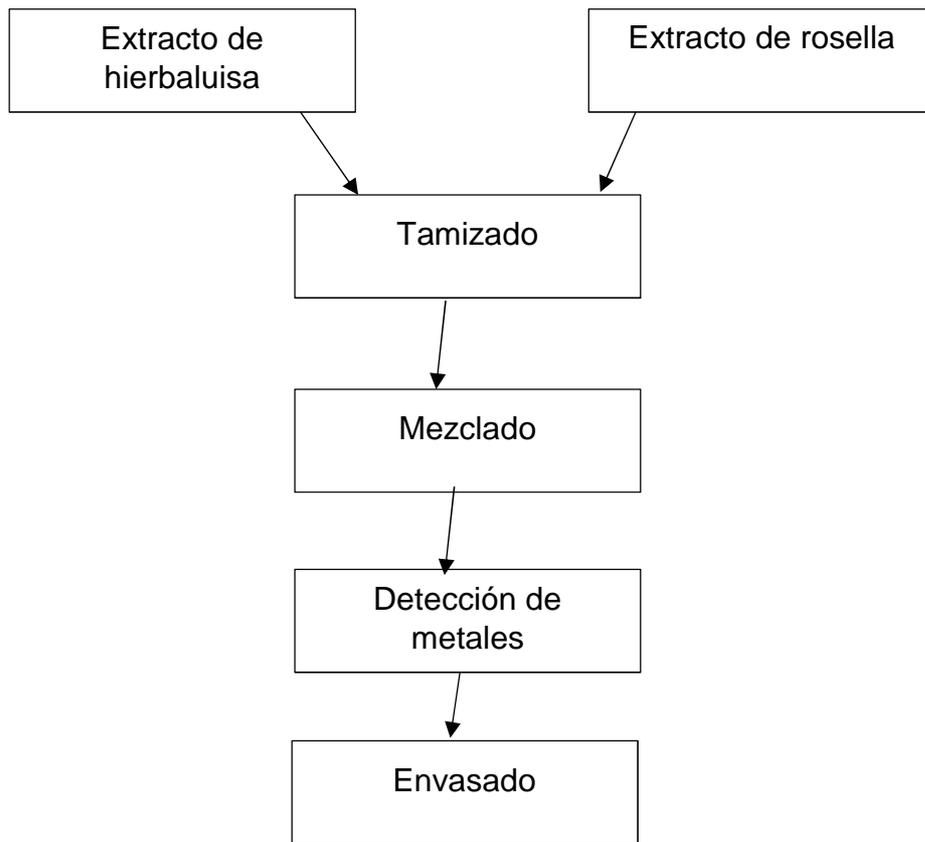


Figura 15



- ②① N.º solicitud: 201731147  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2017  
②③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2013004856 A1 (MONTELOEDER, S. L) 10.01.2013 página 1, líneas 17-22; pág. 2, líneas 26-33; págs. 3, 4; pág. 5, líneas 1-5, líneas 15, 23, Figuras 3, 4; pág. 6, líneas 7-22, Figuras 7, 10, 11; pág. 7, Ejemplo 1; páginas 12-13, Modelo 1; pág. 14, Ejemplos 5, 9; pág. 15; líneas 12-20	1-5, 10-14, 19-21
Y	HERRANZ-LÓPEZ M. et al. Lemon verbena ( <i>Lippia citriodora</i> ) polyphenols alleviate obesity-related disturbances in hypertrophic adipocytes through AMPK-dependent. <i>Phytomedicine</i> , 2015; Vol. 22, nº 6, páginas 605-614 ISSN 0944-7113 Doi:10.1016/j.phymed.2015.03.015	1-5, 10-14, 19-21
Y	KIM, JIN-KYUNG et al. <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the P13-K and MAPK pathway. <i>Journal of Ethnopharmacology</i> , 2007; Vol. 114, nº 2, páginas 260-267 ISSN: 0378-8741. Doi: 10.1016/j.jep.2007.08.028	1-5, 10-14, 19-21
A	BOIX-CASTEJÓN M., HERRANZ-LÓPEZ M. et al. <i>Hibiscus</i> and lemon verbena polyphenols: Assessment for weight management in overweight volunteers. <i>Appetite control and satiety. Free Radical Biology and Medicine</i> , Julio 2017; Vol. 108, Supp. 1, páginas S96-S96. MA P-226 ISSN 0891-5849 Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.311	1-18

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
25.01.2018

Examinador  
A. Sukhwani

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K36/85** (2006.01)

**A61K36/185** (2006.01)

**A23L33/105** (2016.01)

**A61P3/00** (2006.01)

**A61P3/04** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A23L, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, FSTA, CAPLUS, AGRICOLA, SCISEARCH