

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 214**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A23L 33/105	(2006.01)
A23L 33/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2012 PCT/EP2012/072984**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072522**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2012 E 12787032 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2779845**

54 Título: **Extracto de achicoria y método de preparación**

30 Prioridad:

18.11.2011 EP 11306518

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

14.11.2019

73 Titular/es:

**NATUREX S.A. (100.0%)
250 rue Pierre Bayle, BP 81218
84911 Avignon, FR**

72 Inventor/es:

**CHAPAL, NICOLAS y
BEEJMOHUN, VICKRAM**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 731 214 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

Extracto de achicoria y método de preparación

5 La presente invención se refiere a un extracto de achicoria que permite el control del peso corporal o del aumento del peso corporal, la reducción o limitación del aumento del almacenamiento de grasa, del hígado graso, del nivel de triglicéridos en el hígado, de la hipertrigliceridemia, de la hiperglucemia, de la hiperinsulinemia, de la resistencia a la insulina, de la pre-diabetes y/o del síndrome metabólico.

10 Más particularmente, el extracto puede exhibir una acción sobre el factor o factores de riesgo que puede tener un impacto en la cirrosis grasa, enfermedad cardiovascular, complicaciones de la diabetes y/o diabetes. Entre estos factores de riesgo, se puede citar el sobrepeso, en particular la obesidad, el aumento del almacenamiento de grasa, del hígado graso, del nivel de triglicéridos en el hígado, de la hipertrigliceridemia, de la hiperglucemia, de la hiperinsulinemia, de la resistencia a la insulina y/o de diferentes factores del síndrome metabólico.

15 **Antecedentes de la invención**

La sociedad moderna conduce cada vez más al aumento de los factores de riesgo de enfermedades como la cirrosis grasa, las enfermedades cardiovasculares, las complicaciones de la diabetes y/o la diabetes.

20 Los compuestos o composiciones conocidos que se pueden usar para tratar estas enfermedades y/o para limitar uno o varios de sus factores de riesgo, en particular la reducción del peso corporal, pueden ser insuficientes, demasiado costosos y presentan efectos secundarios no deseados, tienen cualidades organolépticas insuficientes que pueden cambiar el color, el sabor y/o el aspecto del alimento con el que se pretenden combinar, son difíciles de introducir en el alimento, al menos con algunos tipos de alimentos, no son suficientemente estables, pueden presentar una baja solubilidad, pueden no ser suficientemente versátiles, pueden derivar de una fuente no lo suficientemente estable y/o abundante, o pueden provenir de un precursor o precursores que pueden tener otros usos.

30 Por otro lado, las dietas para regular el peso corporal a menudo tienen un éxito limitado. Las dietas bajas en calorías, por ejemplo, pueden causar una pérdida temporal del peso corporal, pero no han demostrado su eficacia a largo plazo en las personas que desean perder peso y mantener un peso definido.

35 Por lo tanto, la invención pretende resolver todos o parte de los problemas citados anteriormente. El documento US2005/0003026 describe polvo o extractos de hojas de plantas con efectos antiobesidad y alimentos antiobesidad que comprenden dicho polvo o extractos.

Milala, J. et al, Pol. J. Food. Nutri. Sci., 2009, vol. 59, N.º 1, páginas 35 a 43 describe la composición y propiedades de los extractos de achicoria ricos en fructanos y polifenoles.

40 Jurgonski, A., et al., Food Technol. Biotechnol. 49, (1), páginas 40 a 47 describe la composición de la raíz, piel, semilla y extractos etanólicos de las hojas de achicoria y las propiedades biológicas de sus fracciones que no son inulina.

Mulinacci, N., et al., Chromatographia, 2001, 54, páginas 455 a 461 describe la optimización de las investigaciones cromatográficas de los polifenoles presentes en las partes aéreas de *Cichorium intybus*. L.

45 Conforti, F et al., Food Chemistry, vol. 112, N.º 3, 2009, páginas 587 a 594 describe la actividad protectora de las plantas mediterráneas contra el daño oxidativo.

Innocenti, M., et al., J. Agric. Food Chem. 2005, 53, páginas 6497 a 6502 describe la evaluación de los componentes fenólicos de las partes aéreas de diferentes variedades de *Cichorium intybus* L.

Descripción general de la invención

50 Según un aspecto, la invención tiene por objeto un extracto de una planta del género *Cichorium* que comprende derivados fenólicos, incluidos los tres principales derivados de ácidos fenólicos identificados como ácido chicórico, ácido caftárico y ácido clorogénico e incluyendo flavonoides de quercetina y luteolina de acuerdo con la reivindicación 1.

55 La invención puede mostrar todas o parte de las siguientes ventajas:

- coste muy bajo, además puede valorar una parte de una planta que no se usa hasta ahora, en particular las hojas, pero que se recolecta fácilmente,
- potente efecto biológico,
- 60 – calidad alimentaria del extracto, lo que conlleva la posibilidad de un uso como agente preventivo (ya que tiene poca o ninguna toxicidad), y/o
- facilidad para obtener un agente activo.

Otras ventajas se mostrarán en la siguiente descripción.

65 El extracto puede estar destinado a permitir la reducción o el control del peso corporal o la limitación del aumento de

peso corporal, la reducción o la limitación del aumento del almacenamiento de grasa, del hígado graso, del nivel de triglicéridos en el hígado, de la hipertrigliceridemia, de la hiperglucemia, de la hiperinsulinemia, de la resistencia a la insulina, de la pre-diabetes y/o del síndrome metabólico.

- 5 El extracto se puede usar en un tratamiento curativo o profiláctico del control del peso corporal y/o del aumento de peso y/o del aumento del almacenamiento de grasa y/o del hígado graso y/o del alto nivel de triglicéridos en el hígado, de la prediabetes y/o de la hipertrigliceridemia, y/o de la hiperglucemia, y/o de la hiperinsulinemia, y/o de la resistencia a la insulina, y/o del síndrome metabólico.

10 Breve descripción de las figuras:

La **Figura 1** muestra cromatogramas de HPLC de extractos de plantas hidroalcohólicas a 280 nm

La **Figura 2** muestra el efecto de extractos de achicoria de la invención sobre la glucosa en sangre en ratones obesos prediabéticos.

- 15 La **Figura 3** presenta el efecto de extractos de achicoria de la invención sobre la insulina en la sangre y la resistencia a la insulina en ratones obesos prediabéticos.

La **Figura 4** muestra el efecto de extractos de achicoria de la invención sobre el peso corporal y el almacenamiento de grasa en ratones obesos prediabéticos.

- 20 La **Figura 5** presenta el efecto de extractos de achicoria de la invención sobre el hígado graso o la esteatosis hepática en ratones obesos prediabéticos.

La **Figura 6** muestra el efecto de la dosis de los extractos de achicoria de la invención sobre la glucosa en sangre en ratones obesos prediabéticos.

La **Figura 7** muestra el efecto de un extracto de achicoria bajo en ácido chicórico, y de un extracto de achicoria de la invención sobre el nivel de glucosa en sangre en ratones obesos prediabéticos.

- 25 La **Figura 8** muestra el efecto del ácido chicórico purificado sobre el nivel de glucosa en sangre en ratones obesos prediabéticos.

La **Figura 9** muestra el efecto de un extracto de hoja de *Echinacea* y de un extracto de achicoria de la invención sobre el nivel de glucosa en sangre en ratones obesos prediabéticos.

- 30 La **Figura 10** muestra el efecto de un extracto de hoja de *Echinacea* y de un extracto de achicoria de la invención sobre la insulina en sangre y la resistencia a la insulina en ratones obesos prediabéticos.

Descripción detallada de la invención

- 35 El extracto de una planta del género *Cichorium* de la invención puede proceder de las siguientes especies, y mezclas de las mismas:

- *Cichorium intybus* L.,
- *Cichorium intybus* var. *foliosum*
- *Cichorium intybus* var. *sativum*
- 40 – *Cichorium intybus* ssp. *intybus* var. *sativum* y
- *Cichorium endivia* L.

- 45 La planta del género *Cichorium* se elige preferentemente entre las plantas de la especie *Cichorium intybus*, particularmente la variedad *sativum* y la especie *Cichorium endivia* y sus mezclas.

El extracto se obtiene de la parte aérea de la planta, y más particularmente de las hojas. Así, el extracto puede ser ventajosamente un extracto de la hoja.

- 50 Las expresiones “peso de un extracto de una planta del género *Cichorium*” o “*peso del extracto*” en el sentido de la invención significa el peso seco del extracto de una planta del género *Cichorium* o el peso seco del extracto.

- 55 El extracto de una planta del género *Cichorium* de acuerdo con la invención comprende ácidos fenólicos y flavonoides. Los ácidos fenólicos comprenden los tres ácidos fenólicos principales identificados como ácido chicórico, ácido caftárico y ácido clorogénico. Los flavonoides son flavonoides de quercetina y luteolina en particular quercetina 3-O-glucurónido, isoquercitrina y luteolina 7-O-glucurónido.

- 60 La cantidad de ácido chicórico en el extracto es mayor o igual a 30 g/kg de extracto, y aún más particularmente de más o igual a 45 g/kg de extracto. En realizaciones particulares, la cantidad de ácido chicórico en el extracto puede ser de aproximadamente 65 a 70 g/kg, dependiendo principalmente de la achicoria que se usa para preparar el extracto. En general, la cantidad de ácido chicórico en el extracto oscilará entre 45 y 55 g/kg.

- 65 La cantidad de ácido caftárico en el extracto es ventajosamente mayor o igual a 2,5 g/kg de extracto, más particularmente mayor o igual a 4 g/kg de extracto, y aún más particularmente mayor o igual a 5 g/kg de extracto. En realizaciones particulares, la cantidad de ácido caftárico en el extracto puede ser de hasta aproximadamente 10 g/kg, dependiendo principalmente de la achicoria que se usa para preparar el extracto. En general, la cantidad de

ácido caftárico en el extracto oscilará entre 5 y 6 g/kg.

5 La cantidad de ácido clorogénico en el extracto es ventajosamente mayor o igual a 1 g/kg de extracto, más particularmente de más o igual a 1,5 g/kg de extracto, y aún más particularmente de más o igual a 2 g/kg de extracto. En realizaciones particulares, la cantidad de ácido clorogénico en el extracto puede ser de hasta aproximadamente 10 g/kg, dependiendo principalmente de la achicoria que se usa para preparar el extracto. En general, la cantidad de ácido clorogénico en el extracto oscilará entre 5 y 6 g/kg.

10 El extracto puede comprender una cantidad de ácido caftárico más ácido chicórico de más o igual a 30 g/kg de extracto, más particularmente de más o igual a 40 g/kg de extracto, y aún más particularmente de más o igual a 50 g/kg de extracto, preferiblemente de 50 a 60 g/kg.

15 La relación en peso ácido chicórico/ácido caftárico puede variar de 2 a 20, en particular de 3 a 15, más particularmente de 4 a 14, y aún más particularmente de 6 a 12, ventajosamente de 7 a 11.

La relación en peso ácido chicórico + ácido caftárico/ácido clorogénico puede variar de 5 a 60, en particular de 6 a 40, más particularmente de 7 a 50, y aún más particularmente de 8 a 20, ventajosamente de 9 a 19.

20 La cantidad de flavonoides en el extracto, expresada en términos del correspondiente patrón de quercetina, es ventajosamente mayor o igual a 4,5 g/kg de extracto, más particularmente mayor o igual a 5 g/kg de extracto, y aún más particularmente de más o igual a 6,5 g/kg de extracto, preferiblemente de 6,5 a 10 g/kg.

25 La cantidad de flavonoides se puede determinar utilizando quercetina como patrón, en función de su espectro UV. En otras palabras, la cantidad de flavonoides es el peso de los flavonoides, en particular la quercetina, expresada en términos del patrón correspondiente de quercetina.

El extracto comprende ventajosamente un contenido fenólico total que varía de 3 a 10 % en peso del contenido fenólico total equivalente al ácido gálico.

30 El contenido fenólico total en el extracto se puede determinar de acuerdo con el método que usa el reactivo de Folin-Ciocalteu y/o también mediante HPLC de fase inversa.

35 El método de preparación del extracto según la invención a partir de la materia prima del género *Cichorium* debe seguir un proceso adaptado para dar como resultado un extracto activo que comprende los derivados de ácidos fenólicos y los derivados de flavonoides como se definió anteriormente y en los ejemplos.

40 En particular, el método debe tener en cuenta la estabilidad de los derivados de ácidos fenólicos y los derivados de flavonoides. La purificación del extracto debe realizarse teniendo en cuenta la sensibilidad de los derivados fenólicos a ciertos reactivos como las polifenoles oxidasas, ya que los derivados de ácidos fenólicos y los derivados de flavonoides son sensibles a dichas enzimas. El experto en la materia identificará los componentes que deben evitarse en el proceso de extracción y purificación, basándose en sus propias habilidades y conocimientos y en la divulgación de las realizaciones específicas de la invención.

45 El extracto de acuerdo con la invención es un extracto hidroetanólico. El extracto puede ser en particular el extracto obtenido u obtenible a través del método divulgado en esta descripción.

La invención también se refiere a un extracto de una planta del género *Cichorium*, tal como se divulga en la reivindicación 1 y opcionalmente un vehículo.

50 El vehículo puede ser particularmente un vehículo comestible usado habitualmente para la preparación de composiciones farmacéuticas, composiciones nutracéuticas y suplementos alimenticios o dietéticos. El vehículo puede comprender uno o más agentes saborizantes.

55 La invención también se refiere a un método para preparar un extracto de una planta del género *Cichorium* como se define en la reivindicación 1, proceso de extracción que comprende:

- a) poner en contacto la planta o plantas del género *Cichorium* trituradas con un disolvente de extracción,
- b) filtrar los sólidos y recoger el extracto de disolvente,
- c) opcionalmente lavar los sólidos agitando con un disolvente de extracción,
- 60 d) opcionalmente filtrar los sólidos y recoger el extracto de disolvente,
- e) combinar los extractos de disolvente y eliminar los residuos no solubles,
- f) concentrar los disolventes,
- g) enriquecer opcionalmente los compuestos fenólicos que comprenden el extracto, en particular mediante precipitación con alcohol de grado alimenticio,
- 65 h) filtrar y evaporar el filtrado, y
- i) recuperar el extracto seco, en el que el disolvente de extracción comprende etanol/agua en un intervalo de

60/40 a 40/60 v/v.

El proceso de extracción de la invención se lleva a cabo con las partes aéreas de las plantas, y más preferiblemente con las hojas.

5 La planta del género *Cichorium* se usa seca o fresca y se escalda en la etapa a.

La extracción en la etapa a se realiza ventajosamente a una temperatura superior a 25 °C, particularmente superior a 35 °C, más particularmente superior o igual a 50 °C.

10 En particular, la extracción en la etapa a se realiza ventajosamente a una temperatura por encima de 25 °C, más particularmente por encima de 35 °C, y aún más particularmente de aproximadamente 50 °C.

15 Ventajosamente, la extracción en la etapa a se realiza ventajosamente a una temperatura entre 25 °C y 70 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C.

El disolvente de extracción es agua/etanol en un intervalo de 60/40 a 40/60, y aún más particularmente de alrededor de 50/50.

20 El porcentaje de alcohol, y en particular etanol, utilizado para la extracción puede tener un impacto en el rendimiento y la composición de los compuestos biológicamente activos.

25 La extracción se puede realizar por lotes o de manera continua, o por usos sucesivos de un mismo disolvente de extracción en lotes sucesivos para obtener la saturación del disolvente con el extracto. Para la extracción por lotes, el experto en la materia definirá la proporción en peso adecuada de partes sólidas/disolventes de la planta, optimizada para un proceso industrial. La relación disolvente/sólido puede variar de 2 a 20, en particular de 5 a 15 y más particularmente alrededor de 10 veces el peso de los sólidos. La extracción se puede hacer una o varias veces, en particular de 2 a 4 veces.

30 Las relaciones bajas se pueden utilizar en procesos de extracción por lotes continuos o sucesivos.

El método de la invención se puede realizar a una temperatura que oscila de 25 a 70 °C, en particular de 40 a 60 °C, y más particularmente alrededor de 50 °C.

35 La extracción puede durar de 1 a 5 horas, en particular alrededor de 2 horas, bajo agitación, por ejemplo agitación mecánica o magnética.

Los sólidos restantes pueden ser filtrados, en particular a través de una bolsa de filtro.

40 Según la invención, se pueden combinar varios extractos para formar un único extracto.

Los sólidos húmedos se pueden extraer en otro momento agitando con un disolvente, en particular una mezcla hidroalcohólica, con un volumen de 1 a 100 veces el peso de los sólidos secos, y agitando durante aproximadamente 10 a 120 minutos más.

45 Los sólidos se recogen y los extractos se pueden combinar.

Las diferentes soluciones de extracción se pueden combinar y dejar en decantación, filtrarlas a través de papel de filtro o centrifugar para eliminar residuos no solubles.

50 Los sobrenadantes transparentes obtenidos se pueden concentrar hasta aproximadamente 5 % a 20 % de su volumen inicial, por ejemplo, usando un concentrador, y luego se pueden tratar con alcohol de grado alimenticio, en particular etanol, en una proporción definida, por ejemplo, un mínimo de 2 veces el volumen concentrado, para eliminar cualquier precipitado formado. Esta etapa puede permitir eliminar la totalidad o partes de compuestos no deseados, como polisacáridos o proteínas solubles en agua.

Se puede obtener un extracto en polvo secando los extractos concentrados, por ejemplo, utilizando un secador por pulverización, un horno a 50-80 °C, o un secador por vacío.

60 El extracto seco se pesa (g) y el rendimiento de la extracción se calcula mediante la fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento seco} = (\text{peso del extracto seco} / \text{peso de la planta seca}) \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento fresco} = (\text{peso del extracto seco} / \text{peso del material vegetal en crudo fresco}) \times 100$$

65

Más particularmente, el extracto de la planta se puede obtener mediante el proceso que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) poner en contacto la planta o plantas trituradas y prensadas con 2 a 20 veces, en particular alrededor de 10 veces, su peso con etanol-agua que comprende al menos el 40 % en volumen de etanol, y más particularmente una mezcla de etanol-agua que tiene una relación de volumen 1/1 y agitar, por ejemplo, durante 2 horas, en particular a una temperatura superior a 25 °C, más particularmente superior a 35 °C, y aún más particularmente de alrededor de 50 °C,
- 10 b) filtrar los sólidos y recoger el extracto de disolvente,
- c) lavar los sólidos húmedos agitando con un disolvente de extracción, en particular con un volumen correspondiente a 1 a 100 veces el peso de los sólidos secos, por ejemplo, durante aproximadamente 15 a 120 minutos, particularmente durante 15 a 30 minutos,
- d) filtrar los sólidos y recoger el extracto de disolvente,
- 15 e) combinar las soluciones de extracción y decantarlas o filtrarlas para eliminar los residuos no solubles,
- f) concentrar los disolventes y enriquecer el extracto precipitando en etanol,
- g) concentrar el filtrado a presión reducida y
- h) secar, por ejemplo, en un horno a 50-80 °C al vacío, por ejemplo con secado por pulverización al vacío, o el concentrado puede congelarse para liofilización, y
- 20 i) recuperar el extracto seco.

En general, el rendimiento de extracción oscila entre 1,5 y 3,5 % en peso de extracto en comparación con el peso total de la torta recién triturada. El rendimiento varía de 12 a 17 % cuando se usan hojas secas.

25 El extracto de la planta se puede preparar a escala comercial repitiendo el proceso de extracción que lleva al aislamiento del extracto de interés.

Por lo tanto, el procedimiento de extracción a pequeña escala se puede ampliar, con etapas adicionales opcionales de control de calidad incluidas para garantizar resultados reproducibles para los extractos resultantes.

30 Se pueden emplear varios procesos de extracción. En general, el extracto se obtiene poniendo en contacto la planta o plantas sólidas con el disolvente hidroetanólico con una mezcla adecuada y durante un período de tiempo suficiente para asegurar la exposición adecuada del material vegetal sólido al disolvente, de modo que las moléculas biológicamente activas presentes en el material vegetal puedan ser absorbidas por el disolvente.

35 El proceso de extracción con disolvente puede seleccionarse de tipos de extracción directa y continua (contracorriente) a temperatura ambiente o a una temperatura más alta con disolventes polares y/o no polares. El contacto adecuado del disolvente con el material vegetal puede fomentarse agitando la suspensión. La fracción líquida se separa a continuación de la materia sólida (insoluble), lo que da como resultado la generación de dos fracciones: una fracción líquida, que es el extracto potencial, y una fracción sólida. La separación de las fracciones líquidas y sólidas se puede lograr mediante uno o más procesos estándar conocidos por los expertos en la materia.

La invención también se refiere a un extracto susceptible de ser obtenido u obtenible por el proceso de la invención, comprendiendo dicho extracto ácidos fenólicos y flavonoides como se define en las reivindicaciones adjuntas.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación del extracto de *Cichorium intybus* L

Materiales y métodos

50 Antes de la extracción se cortan en trozos pequeños (5-8 mm) las partes aéreas secas (100 g) de *Cichorium intybus* L.

Proceso de extracción

55 La planta se extrae con aproximadamente 1000 ml de un 50 % de etanol/agua (V/V) durante 2 horas a 50 °C, con agitación mecánica. Al final del período de extracción, los sólidos se filtran a través de una bolsa de filtro (PE-100) u otro material de filtración similar.

60 Los sólidos húmedos se extraen una vez más agitando con otros 3 volúmenes de etanol al 50 % durante aproximadamente 15 a 30 minutos más.

Los sólidos se filtran de nuevo y los extractos obtenidos se combinan y se obtienen 980 ml del extracto líquido, se dejan decantar y se filtran a través de papel de filtro o se centrifugan para eliminar los residuos no solubles.

65 La solución de extracción se concentró a presión reducida hasta un 5-20 % de su volumen inicial y a continuación se

enriqueció precipitando en etanol de grado alimenticio. El filtrado se concentra de nuevo y se deja hasta que se seca. El extracto seco se recupera.

5 Los cromatogramas de HPLC de los extractos de las plantas a 280 nm del Ejemplo 1 se muestran en la Figura 1 como Cromatograma I, en el que A se refiere a ácido caftárico, B a ácido clorogénico, C a ácido chicórico, D a quercetina 3-O-glucurónido e isoquercitrina y E a luteolina 7-O-glucurónido. Además, la composición del extracto se muestra en la Tabla 1 a continuación.

10 **Ejemplo 2: Preparación de los extractos de *Cichorium intybus* ssp. *intybus* var. *sativum***

Se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, excepto que se utilizaron partes aéreas frescas de *Cichorium intybus* ssp. *intybus* var. *sativum* y se blanquearon antes de la etapa de corte.

15 Los cromatogramas de HPLC de los extractos de plantas a 280 nm del Ejemplo 2 se muestran en la Figura 1 como Cromatograma II en el que A se refiere a ácido caftárico, B a ácido clorogénico C a ácido chicórico, D a quercetina 3-O-glucurónido e isoquercitrina, y E a luteolina 7-O-glucurónido. Además, la composición del extracto se muestra en la Tabla 1 a continuación.

20 **Ejemplo 3: composición de los extractos de los ejemplos 1 y 2**

Métodos analíticos

25 Los extractos de los ejemplos 1 y 2 comprendían entre 3 y 7 % en peso de contenido fenólico total equivalente al ácido gálico, utilizando el método de Folin-Ciocalteu. Caracterización y cuantificación del contenido de polifenoles por HPLC:

- Análisis de HPLC-DAD:

30 La HPLC analítica (Dionex) se configura según necesidad. En esta invención, la fase móvil utilizada fue ácido fórmico 0,1 % en 1000 ml de agua de alta pureza (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B), utilizando el siguiente gradiente en un tiempo de análisis total de 96 minutos con un caudal de 0,8 ml/min. Los puntos de gradiente fueron para el tiempo 0,0 minutos - 95 % A y 5 % B; para el tiempo 10 minutos - 90 % A y 10 % B; gradiente isocrático durante 10 minutos y de 20 minutos a 40 minutos, el gradiente varió linealmente de 10 % a 20 % de B; de nuevo se mantuvo isocrático durante 10 minutos; de 50 minutos a 65 minutos, el gradiente varió linealmente de 20 % a 30 % de B y 50 % durante los siguientes 10 minutos; de 75 minutos a 86 minutos, el gradiente varió linealmente de 50 % a 100 % de B y se mantuvo isocrático durante 10 minutos. De 85 minutos a 86 minutos se volvió a las condiciones originales de 95 % de A y 5 % de B y se mantuvo isocrático durante 10 minutos. Los compuestos fenólicos en el eluyente se detectaron con un conjunto de diodos UV a 280 nm utilizando una columna C-18 de fase inversa (250 X 4,6 mm ID x 5 µm; ACE). Las cantidades de ácidos fenólicos en los extractos se determinaron utilizando curvas de calibración de: ácido caftárico, ácido clorogénico, ácido chicórico y las cantidades de flavonoides en los extractos se determinaron utilizando curvas de calibración de quercetina.

- Análisis de HPLC-DAD/ESI-MS:

45 El análisis de HPLC/MS del extracto se realizó utilizando HPLC (Thermo Finnigan Surveyor), conectada a un espectrómetro de trampa de iones LCQ equipado con una interfaz de electronebulización (Thermo Finnigan, LCQ Advantage max). El programa de elución fue el mismo que el anterior, y el experimento se realizó en modo negativo y positivo. Los espectros se escanearon en un intervalo de masa de m/z 80-2000.

50

Tabla 1

Extractos de plantas	Derivados de ácidos fenólicos			Contenido de derivados flavonoides (D - E) (g de quercetina/kg de extracto)	Contenido total de polifenoles (g de ácido gálico/kg de extracto)
	Ácido caftárico (A) (g/kg de extracto)	Ácido clorogénico (B) (g/kg de extracto)	Ácido chicórico (C) (g/kg de extracto)		
Ej. 1	5,01 g	6,5 g	54,52 g	6,97 g	69 g
Ej. 2	5,97 g	2,79 g	46,82 g	9,91 g	54 g

Composición cuantitativa de los extractos de los Ejemplos 1 y 2 por HPLC a 280 nm

Ejemplo 4: Efecto del extracto de hoja de achicoria (CLE) sobre la glucosa en sangre (glucemia), insulina en sangre (insulinemia), resistencia a la insulina, peso corporal, almacenamiento de grasa e hígado graso

Materiales y métodos

5 Se usaron para el experimento ratones C57BL/6NCrI de cinco semanas de edad (Charles River Laboratories, Francia) que pesaban alrededor de 20 g. Después de 8 días de aclimatación, los ratones se asignaron al azar a los diferentes grupos experimentales (9 animales por grupo) de acuerdo con su glucemia en ayunas.

10 En el día 0, un grupo se mantuvo con una dieta normal (23 % de las calorías procedían de las proteínas, 66 % de los carbohidratos y el 11 % de la grasa) y los otros se sometieron a una dieta rica en grasas (el 17 % de las calorías procedían de las proteínas, el 28 % de hidratos de carbono, y el 55 % de la grasa). Los ratones tenían acceso *ad libitum* a la comida y al agua. Las formulaciones de dosificación se administraron por sonda oral cada mañana entre las 9 h y las 10 h desde el día 1 hasta el día 56. El volumen de la dosis fue de 10 ml/kg de peso corporal. El volumen real administrado se calculó y ajustó en función del peso corporal más reciente de cada animal. Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

- Control normal: los ratones fueron alimentados con una dieta normal y se les administró agua una vez al día.
- Control con alto contenido de grasa: los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas y se les administró agua una vez al día.
- CLE 400 mg/kg: los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas y se les administró extracto de hoja de achicoria (CLE) una vez al día en una dosis de 400 mg/kg de peso corporal.

25 El efecto del CLE sobre la glucemia se muestra en la Figura 2, sobre la insulina y la resistencia a la insulina en la Figura 3, sobre el peso corporal y el almacenamiento de grasa en la Figura 4, y sobre el hígado graso en la Figura 5.

Los pesos corporales de los ratones se registraron a la llegada y luego 3 veces a la semana (los lunes, miércoles y viernes).

30 Los niveles de glucosa en sangre en ayunas se midieron el día de la aleatorización (día 0) y en los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 entre las 13h 00 y las 14h 00 en animales en ayunas durante 4 horas. Se tomaron muestras de sangre completa (una gota) a través de la vena de la cola para la determinación de la glucosa utilizando un glucómetro de mano (OneTouch Ultra 2, LifeScan).

35 Al final del estudio, después de un ayuno de 4 horas, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de 0,1 ml de pentobarbital sódico. Se extrajo una muestra de sangre terminal mediante punción cardíaca utilizando heparina como anticoagulante. Esta muestra de sangre terminal conduce a la muerte de los animales. Las muestras de sangre se colocaron a 4 °C, se centrifugaron en los 30 minutos posteriores a la recolección; el plasma se recogió y se congeló a la espera del análisis de insulina. Se extrajo grasa de la almohadilla del epidídimo (grasa abdominal) y del hígado para determinar sus pesos.

45 Los niveles de insulina en plasma en ayunas se midieron utilizando un kit ELISA (Mercodia, Suecia). A continuación, se calcularon los índices de resistencia a la insulina (HOMA-IR) utilizando la fórmula: $HOMA-IR = \frac{\text{insulina en ayunas (mU/l)} \times \text{glucosa en ayunas (mmol/l)}}{22,5}$.

Este protocolo fue aprobado por el Comité Regional de Ética (Montpellier, Francia).

Resultados

50 *Glucosa en sangre (Figura 2)*

Después de una semana de dietas (día 7), la glucemia en ayunas de los ratones sometidos a una dieta rica en grasas fue significativamente mayor ($168 \pm 5,7$ mg/dl) que la de los ratones sometidos a una dieta normal ($121 \pm 5,9$ mg/dl). A partir de entonces, esta diferencia se mantuvo prácticamente constante durante todo el estudio.

55 El extracto de hoja de achicoria redujo la glucemia de los ratones prediabéticos. Al final del estudio (día 56), la glucemia se redujo en un 58 %. Este efecto es claramente significativo en los días 14, 28, 35, 42, 49 y 56.

60 *Insulina en sangre y resistencia a la insulina (Figura 3)*

La insulinemia en ayunas también aumentó significativamente con la dieta rica en grasas, alcanzando $4,70 \pm 0,43$ ng/ml en comparación con $1,53 \pm 0,37$ ng/ml para ratones sometidos a dieta normal. En consonancia con estos aumentos en la glucemia y la insulinemia en ayunas inducidas por una dieta rica en grasas, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se multiplicó por 5, lo que demuestra que estos animales son muy resistentes a la insulina.

65 Al final del período de tratamiento (Día 56), el CLE redujo significativamente el nivel de insulina en la sangre en

ayunas inducido por la dieta rica en grasas ($p < 0,05$). La insulinemia alcanzó $3,31 \pm 0,40$ ng/ml para los ratones tratados con CLE. Por lo tanto, de acuerdo con el índice de resistencia a la insulina HOMA-IR, el CLE redujo en un 58 % la resistencia a la insulina inducida por la dieta rica en grasas en ratones prediabéticos ($p < 0,01$).

5 *Peso corporal y peso de la grasa abdominal (Figura 4)*

Los ratones sometidos a una dieta rica en grasas ganaron mucho más peso que aquellos que recibieron una dieta normal. Al final del estudio, después de 8 semanas de dieta, los ratones con dieta rica en grasas ganaron 2,5 veces más peso que los ratones de control con dieta regular. Alcanzaron $36,8 \pm 1,3$ g, mientras que los ratones con dieta normal alcanzaron $26,3 \pm 0,5$ g.

Este aumento del peso corporal inducido por la dieta se debe principalmente al almacenamiento de la energía en forma de grasa abdominal. De hecho, los pesos de grasa en el epidídimo (abdominal) de ratones con dieta rica en grasas se multiplicaron por 3,5 durante el estudio en comparación con los de los ratones con dieta normal: $1,80 \pm 0,11$ y $0,51 \pm 0,03$ g para dieta rica en grasas y normal, respectivamente. Se reconoce que la grasa perivisceral está asociada o es un factor de riesgo importante de resistencia a la insulina y síndrome metabólico.

El CLE a la dosis de 400 mg/kg de peso corporal redujo el aumento de peso corporal inducido por una dieta rica en grasas. Este efecto es significativo desde el Día 4 del tratamiento y dura todo el estudio ($p < 0,01$ desde el Día 6). Al final del estudio, los ratones con dieta rica en grasas tratados con CLE ganaron $10,1 \pm 0,8$ g, mientras que los ratones con dieta rica en grasas tratados con agua ganaron $15,4 \pm 1,3$ g y los ratones con dieta normal tratados con agua ganaron $6,1 \pm 0,4$ g.

Esta reducción se debe al menos en parte a una reducción del almacenamiento de grasa en la grasa abdominal. El CLE redujo en un 33 % el almacenamiento de grasa en la grasa del epidídimo en ratones sometidos a una dieta rica en grasas ($p < 0,05$). El peso de la grasa del epidídimo de los ratones tratados con CLE fue de $1,38 \pm 0,15$ g, en comparación con $1,80 \pm 0,11$ y $0,51 \pm 0,03$ g para los ratones control de dieta rica en grasas y los ratones control de dieta normal, respectivamente.

30 *Peso del hígado (Figura 5)*

La dieta con un contenido alto en grasas indujo el almacenamiento de grasa en el hígado: lo que se llama hígado graso o esteatosis hepática. El color del hígado se volvió blanco en lugar de rojo en los ratones con dieta normal y su peso aumentó en un 35 %: $1,38 \pm 0,10$ g para una dieta rica en grasas frente a $1,02 \pm 0,03$ g para una dieta normal.

El CLE casi normalizó el hígado graso que se redujo en un 83 % ($p < 0,01$).

40 Conclusiones

La dieta rica en grasas induce un fenotipo claro de síndrome metabólico en ratones C57BL/6 con un aumento significativo en el aumento de peso corporal, almacenamiento de grasa abdominal, hígado graso, glucemia en ayunas, insulinemia y resistencia a la insulina.

45 El extracto de hoja de achicoria a la dosis de 400 mg/kg de peso corporal redujo notablemente los defectos inducidos por el consumo crónico de la dieta rica en grasas en ratones. Estos comprenden:

- Reducción de la glucemia en ayunas.
- Reducción de la insulinemia en ayunas.
- 50 – Reducción de la resistencia a la insulina.
- Reducción del aumento de peso corporal.
- Reducción del almacenamiento de grasa abdominal.
- Reducción de la esteatosis hepática.

55 Por lo tanto, se muestra que el extracto de hoja de achicoria es un buen ingrediente para una buena salud para tratar uno o varios síndromes metabólicos y defectos relacionados.

Ejemplo 5: Efecto de la dosis de extractos de hojas de achicoria (CLE) sobre la glucosa en sangre (glucemia)

60 Materiales y métodos

El protocolo fue el mismo que para el Ejemplo 4.

Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

65

- Control normal: los ratones fueron alimentados con una dieta normal y se les administró agua una vez al día.
- Control de alto contenido en grasas: los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas y se les administró agua una vez al día.
- Extracto de hoja de achicoria (CLE) 100, 200 o 400 mg/kg: los ratones fueron alimentados con una dieta rica en grasas y se les administró CLE una vez al día a la dosis de 100, 200 o 400 mg/kg de peso corporal.

Resultados

Glucosa en sangre (Figura 6)

Después de una semana de dietas (día 7), la glucemia en ayunas de los ratones sometidos a una dieta rica en grasas fue significativamente mayor ($159 \pm 3,9$ mg/dl) que la de los ratones sometidos a una dieta normal ($109 \pm 3,6$ mg/dl). A partir de entonces, esta diferencia se mantuvo prácticamente constante en todo el estudio.

El extracto de hoja de achicoria redujo la glucemia de los ratones prediabéticos del día 14 al día 42. Este efecto aumentó con la dosis de CLE y es significativo en todo el estudio, para las 3 dosis. Al final del estudio, la glucemia alcanzó $187 \pm 3,2$, $177 \pm 3,1$, $171 \pm 6,3$ mg/dl para 100, 200 y 400 mg/kg, respectivamente, en comparación con $200 \pm 5,4$ mg/dl para el control.

Conclusiones

El extracto de hoja de achicoria (CLE) redujo notablemente la hiperglucemia en ayunas inducida por el consumo crónico de dieta rica en grasas en ratones de forma dependiente de la dosis. Este efecto ya es significativo con la dosis más baja probada: 100 mg/kg de peso corporal.

Ejemplo 6: Los extractos de hoja de achicoria (CLE) que contienen niveles bajos de ácido chicórico son menos efectivos para reducir la glucosa en sangre

Materiales y métodos

CLE con nivel bajo de ácido chicórico - Proceso de extracción (no de acuerdo con la invención)

Se extrajo CLE con nivel bajo de ácido chicórico siguiendo el proceso de extracción presentado en el Ejemplo 2, excepto que no se realizó la etapa de escaldado antes de cortar. En consecuencia, las polifenol oxidasas de la planta no se inactivaron, lo que lleva a un nivel más bajo de polifenoles. El CLE con nivel bajo de ácido chicórico contenía 1,05 % de ácido chicórico.

CLE - Proceso de extracción

El CLE se extrajo siguiendo el proceso de extracción presentado en el Ejemplo 2. El CLE contenía 4,68 % de ácido chicórico.

Protocolo farmacológico

El protocolo es comparable al del Ejemplo 4, pero los ratones C57BL/6 se sometieron a una dieta rica en grasas durante 1 semana para inducir prediabetes antes del inicio del tratamiento. A continuación, se administraron CLE y CLE con nivel bajo de ácido chicórico durante 3 semanas mediante sonda oral a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal.

Resultados

Efecto sobre la glucemia en ayunas (Figura 7)

Después de una semana de dietas, la glucemia en ayunas de los ratones sometidos a una dieta rica en grasas ($159,6 \pm 4,9$ mg/dl) fue significativamente más alta ($p < 0,001$) que la de los ratones sometidos a una dieta normal ($95,2 \pm 4$ mg/dl). Estos resultados confirman el hecho de que los ratones con dieta rica en grasas eran hiperglucémicos al inicio del tratamiento.

El CLE redujo la glucemia de los ratones prediabéticos en un 31,5 % de media (% de reducción para volver a los valores normales observados con el control normal). Este efecto fue claramente significativo desde la primera semana de tratamiento y duró hasta el final del estudio (véase la Figura 7: $*p < 0,05$ en el Día 7 y $***p < 0,001$ en el Día 14 y 21).

Por el contrario el CLE con nivel bajo de ácido chicórico tuvo un efecto mucho menor. Redujo la glucemia en ratones prediabéticos en un 10,6 % de promedio. Este efecto fue significativo en el Día 14 (ver Figura 7: $*p < 0,05$) pero no en el Día 7 ni en el 21.

Conclusiones

5 Los ratones C57BL/6 sometidos a dieta rica en grasas durante 1 semana se convirtieron en hiperglucémicos. El extracto de hoja de achicoria (CLE; que contiene 4,68 % de ácido chicórico) a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal redujo notablemente la hiperglucemia y este efecto está relacionado con la presencia de una cantidad suficiente de ácido chicórico en el extracto, ya que el CLE con nivel bajo de ácido chicórico (que contiene 1,05 % de ácido chicórico) fue poco eficiente.

10 Por lo tanto, el ácido chicórico es uno de los componentes del CLE que es importante para la eficacia del extracto. Es necesaria una cantidad suficiente de ácido chicórico en el extracto para observar un efecto sobre la reducción de la glucemia.

Ejemplo 7: El ácido chicórico purificado (25 %) no es eficaz para reducir la glucosa en sangre

15 Materiales y métodos

Ácido chicórico purificado (25 %)

20 El ácido chicórico purificado se obtuvo de una fuente comercial. Brevemente, los polifenoles extraídos de una fuente vegetal se purificaron en una resina adsorbente lo que dio lugar a un producto rico en polifenoles y que contiene alrededor del 25 % de ácido chicórico.

Protocolo farmacológico

25 El protocolo es comparable al del Ejemplo 4, pero los ratones C57BL/6 se sometieron a una dieta rica en grasas durante 1 semana para inducir hiperglucemia antes del inicio del tratamiento. A continuación, se administró ácido chicórico purificado al 25 % durante 8 semanas mediante sonda oral a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal.

Resultados

30 Efecto sobre la glucemia en ayunas (Figura 8)

A diferencia del CLE, el ácido chicórico purificado (25 %) no tuvo ningún efecto sobre la glucemia en ayunas de los ratones prediabéticos incluso después de 8 semanas de tratamiento (Figura 8).

35 Conclusiones

40 Por lo tanto, aunque el ácido chicórico es un componente esencial para la eficacia del CLE, no es suficiente. Los cofactores, que se suprimen en la purificación del ácido chicórico, también son importantes para el efecto del CLE en la reducción de la glucemia en ayunas en ratones prediabéticos.

Ejemplo 8: Los extractos de hojas de achicoria (CLE) son más potentes que un extracto de hojas de *Echinacea* (EchLE)

45 Materiales y métodos

Extracto de Hoja de *Echinacea* (EchLE) - Proceso de extracción

50 El EchLE se extrajo siguiendo el proceso de extracción presentado en el Ejemplo 1. El EchLE contenía 3,32 % de ácido chicórico.

Extracto de hoja de achicoria (CLE) - Proceso de extracción

El CLE se extrajo siguiendo el proceso de extracción presentado en el Ejemplo 2. El CLE contenía 4,68 % de ácido chicórico.

55 Protocolo farmacológico

60 El protocolo es idéntico al del Ejemplo 6. Los ratones C57BL/6 se sometieron a una dieta rica en grasas durante 1 semana para inducir la prediabetes antes del inicio del tratamiento. A continuación, se administraron CLE y EchLE durante 3 semanas mediante sonda oral a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal.

Resultados

Efecto sobre la glucemia en ayunas (Figura 9)

65 El extracto de CLE redujo la glucemia de los ratones prediabéticos en un 31,5 % de media (% de reducción para volver a los valores normales observados con el Control Normal). Este efecto fue claramente significativo desde la

primera semana de tratamiento y duró hasta el final del estudio (véase la Figura 9: * $p < 0,05$ en el Día 7 y *** $p < 0,001$ en el Día 14 y 21).

5 El EchLE presentó un efecto mucho menor. Redujo la glucemia en ratones prediabéticos en un 13,1 % de media. Este efecto fue significativo en el día 21 (véase la Figura 9: * $p < 0,05$) pero no en el día 7 ni en el 14.

Insulina sanguínea y resistencia a la insulina (Figura 10)

10 Al final del período de tratamiento (día 21), la insulinemia en ayunas también se incrementó significativamente con la dieta rica en grasas, alcanzando $5,26 \pm 0,27$ ng/ml en comparación con $2,43 \pm 0,20$ ng/ml para ratones con dieta normal. En consonancia con estos aumentos en la glucemia en ayunas y la insulinemia, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se multiplicó por 3, lo que demuestra que los ratones eran claramente resistentes a la insulina al final del protocolo.

15 El CLE redujo significativamente el nivel de insulina en la sangre en ayunas inducido por la dieta rica en grasas hasta $4,16 \pm 0,23$ ng/ml (Figura 10: ** $p < 0,01$). Por lo tanto, de acuerdo con el índice de resistencia a la insulina HOMA-IR, el CLE redujo en un 45,9 % la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas en ratones prediabéticos (Figura 10: *** $p < 0,001$).

20 En la misma condición, el EchLE redujo ligeramente la insulinemia hasta $4,16 \pm 0,24$ ng/ml, pero este efecto no es estadísticamente significativo. Además, la resistencia a la insulina no se redujo significativamente en un 18,7 % (Figura 10).

Conclusiones

25 El extracto de hoja de achicoria (CLE; que contiene 4,68 % de ácido chicórico), en una dosis de 200 mg/kg de peso corporal, redujo notablemente la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina de ratones prediabéticos. Estos efectos están asociados con la presencia de una cantidad suficiente de ácido chicórico en el extracto, pero también con el origen de la achicoria del extracto, ya que el extracto de hoja de *Echinacea* (EchLE),
30 que contiene una cantidad bastante elevada de ácido chicórico (3,32 % de ácido chicórico), es mucho menos eficiente. Los cofactores, presentes en el género *Cichorium* pero no en el género *Echinacea*, son importantes para los efectos del CLE.

35 En conjunto, estos resultados muestran que el ácido chicórico y los cofactores en el extracto proveniente del género *Cichorium* son importantes para la eficacia del CLE.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto hidroetanólico de las partes aéreas de una planta del género *Cichorium* que comprende los ácidos fenólicos ácido chicórico, ácido caftárico y ácido clorogénico, y los flavonoides quercetina y luteolina, en donde la cantidad de ácido chicórico es mayor o igual a 30 g/kg del peso seco del extracto, y opcionalmente un vehículo, y en donde el disolvente de extracción es etanol/agua en un intervalo de 60/40 a 40/60 v/v y las partes aéreas están secas o están frescas y escaldadas.
- 10 2. El extracto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de ácido caftárico es mayor o igual a 2,5 g/kg del peso seco del extracto.
3. El extracto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la cantidad de ácido clorogénico es mayor o igual a 1 g/kg del peso seco del extracto.
- 15 4. El extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad de flavonoides en el extracto, expresada en términos del patrón correspondiente de quercetina, es mayor o igual a 4,5 g/kg del peso seco del extracto.
- 20 5. Un método para la preparación de un extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicho método
- 25 a) poner en contacto las partes áreas trituradas de una planta del género *Cichorium* con un disolvente de extracción,
b) filtrar los sólidos y recoger el extracto de disolvente,
c) opcionalmente lavar los sólidos agitando con un disolvente de extracción,
d) opcionalmente filtrar los sólidos y recoger el extracto de disolvente,
e) combinar los extractos de disolvente y eliminar los residuos no solubles,
f) concentrar los disolventes,
30 g) enriquecer opcionalmente los compuestos fenólicos que comprenden el extracto, en particular mediante precipitación usando alcohol de grado alimenticio,
h) filtrar y evaporar el filtrado, y
i) recuperar el extracto seco,
- 35 en donde el método se realiza a una temperatura que varía de 40 a 60 °C y el disolvente de extracción es etanol/agua en un intervalo de 60/40 a 40/60 v/v y las partes aéreas de la planta están secas o están frescas y escaldadas.
- 40 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la planta del género *Cichorium* se selecciona del grupo que consiste en plantas de la especie *Cichorium intybus*, plantas de la especie *Cichorium endivia* y mezclas de las mismas.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en el que el disolvente de extracción comprende agua y etanol en una relación en volumen de agua/etanol de 50/50.
- 45 8. Un extracto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en:
- 50 - un tratamiento curativo o profiláctico del control del peso corporal y/o del aumento de peso,
- un tratamiento curativo o profiláctico del aumento del almacenamiento de grasa y/o del hígado graso,
- un tratamiento curativo o profiláctico de la pre-diabetes, y
- un tratamiento curativo o profiláctico del síndrome metabólico.
- 55 9. Un extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en:
- 60 - un tratamiento curativo o profiláctico del nivel alto de triglicéridos en el hígado,
- un tratamiento curativo o profiláctico de la hipertrigliceridemia,
- un tratamiento curativo o profiláctico de la hiperglucemia,
- un tratamiento curativo o profiláctico de la hiperinsulinemia, y
- un tratamiento curativo o profiláctico de la resistencia a la insulina.

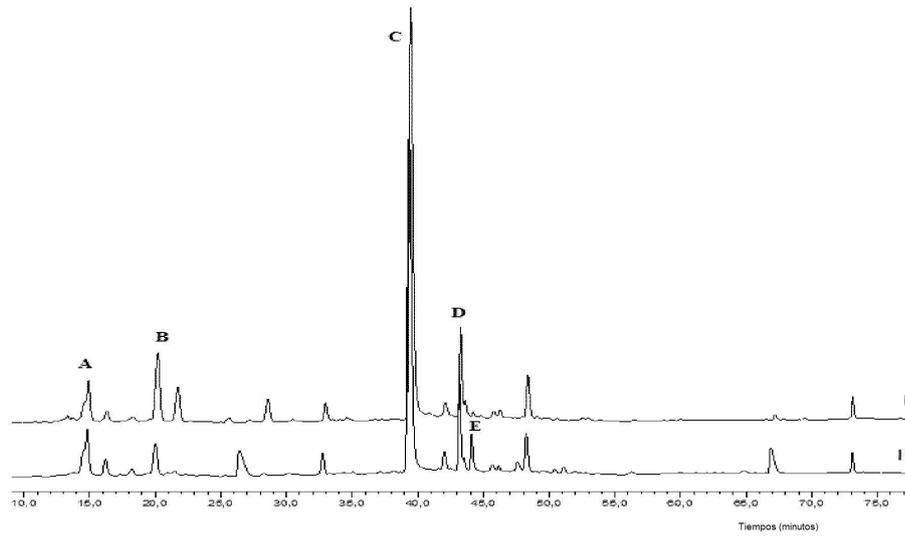


Figura 1

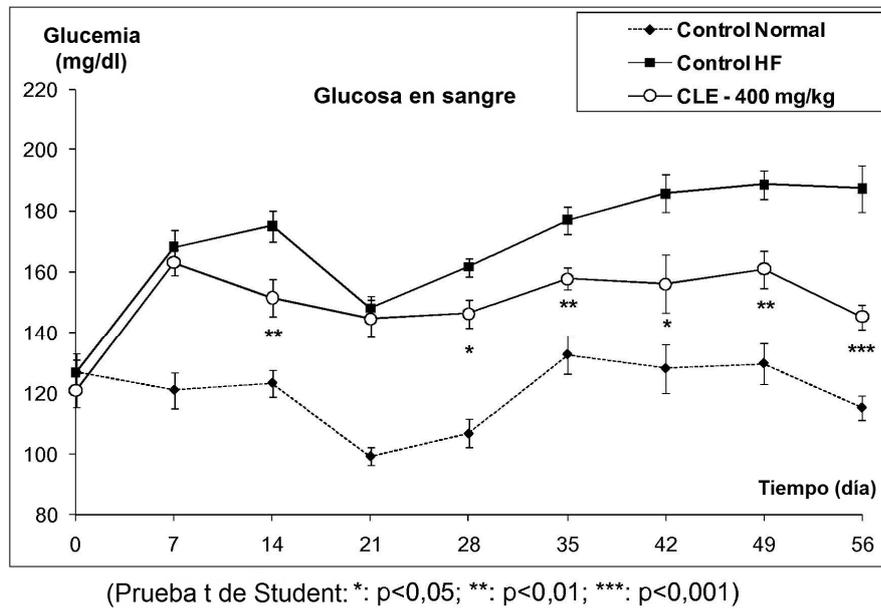
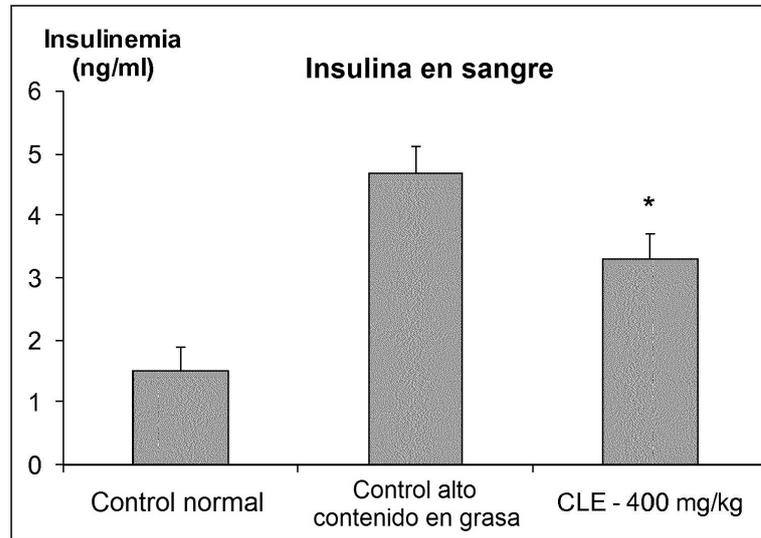
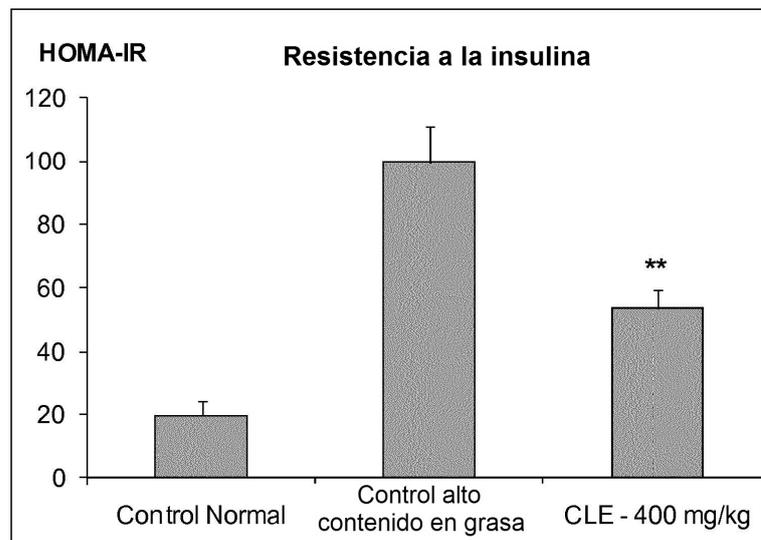


Figura 2

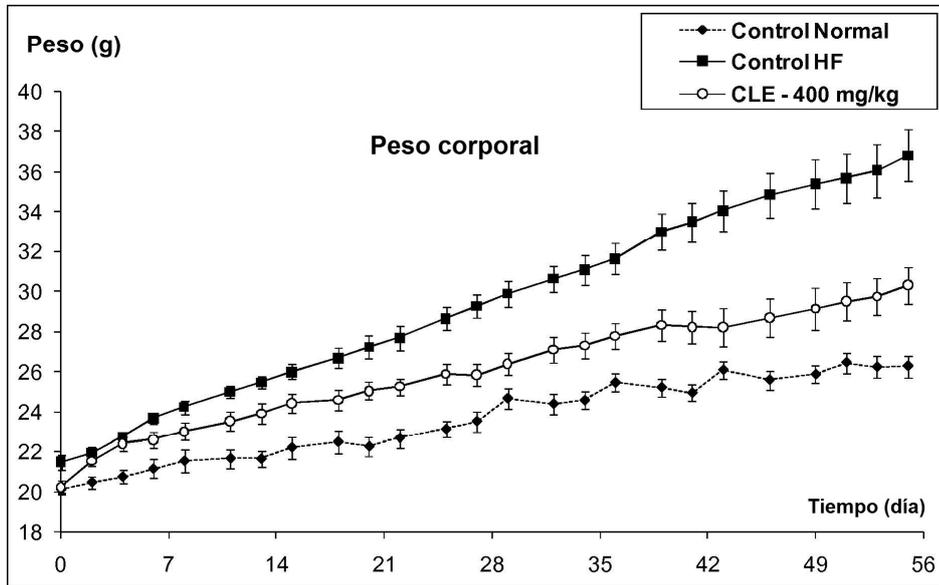


(Prueba t de Student: *: $p < 0,05$)

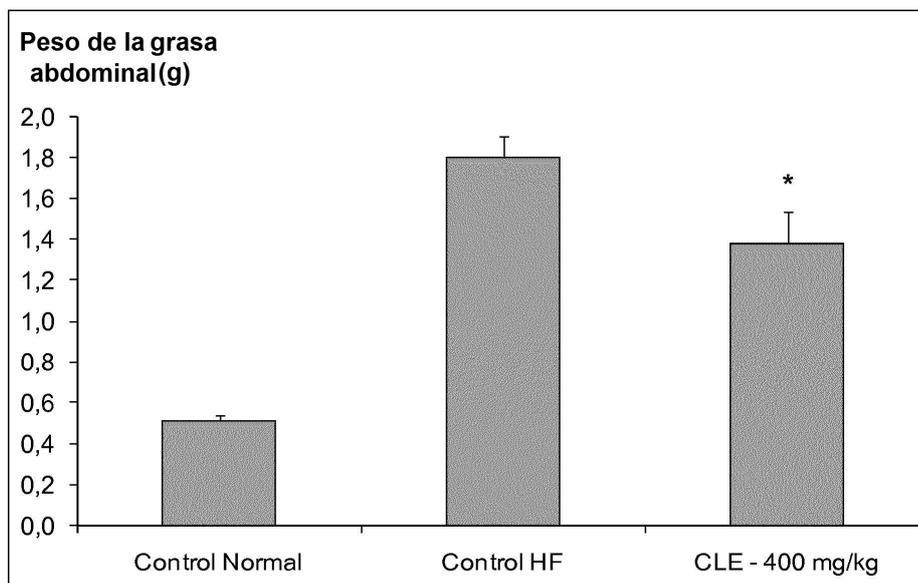


(Prueba t de Student: **: $p < 0,01$)

Figura 3



(Prueba t de Student: $p < 0,05$ desde el día 6)



(Prueba t de Student: *: $p < 0,05$)

Figura 4

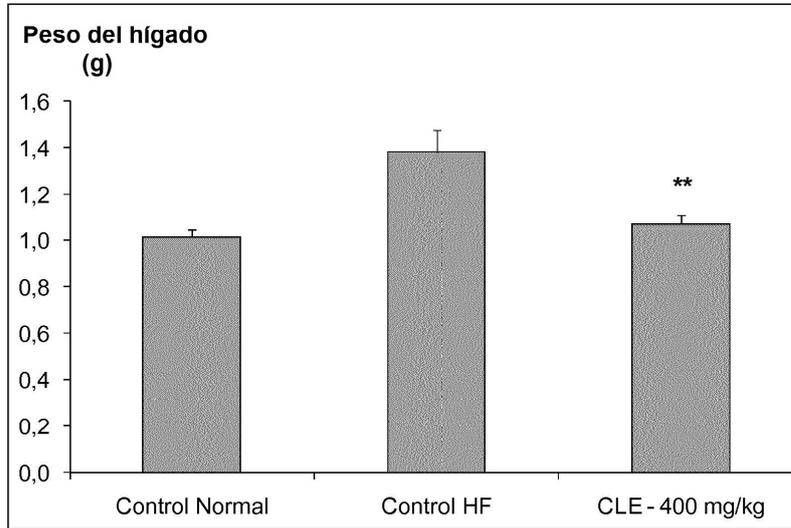
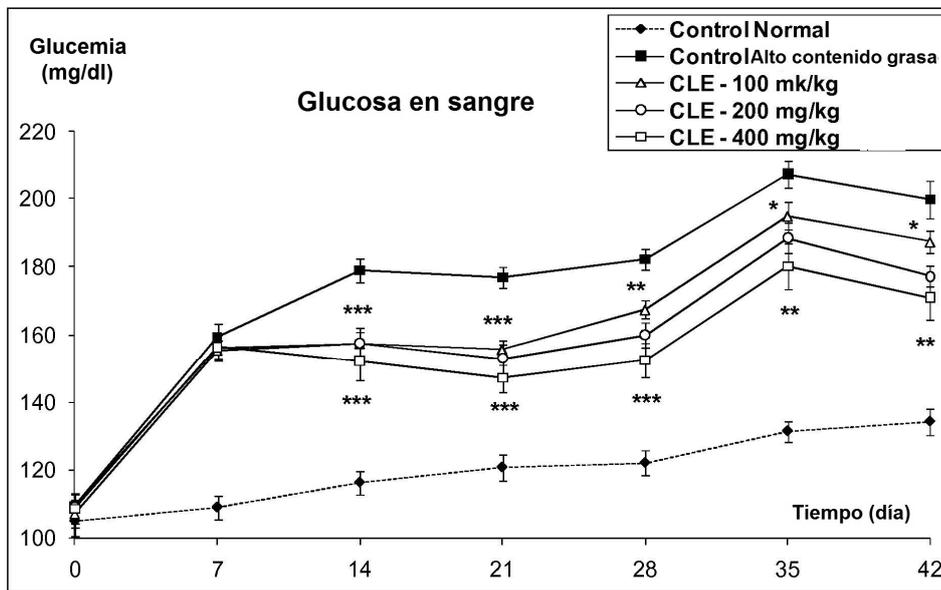
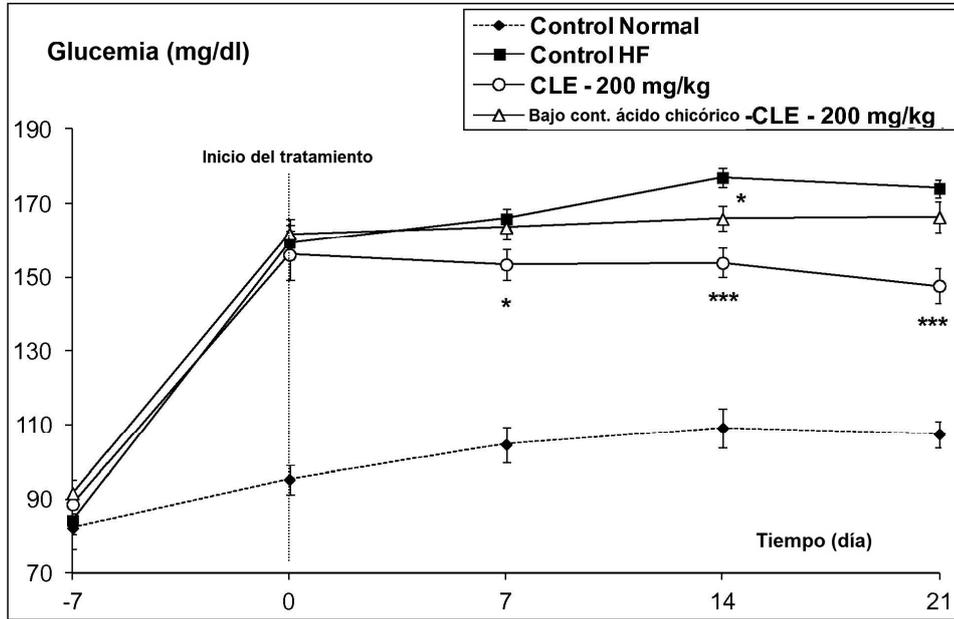


Figura 5



(valores p para CLE 100 y 400 mg/kg: *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001)

Figura 6



(Prueba t de Student: *: $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

Figura 7

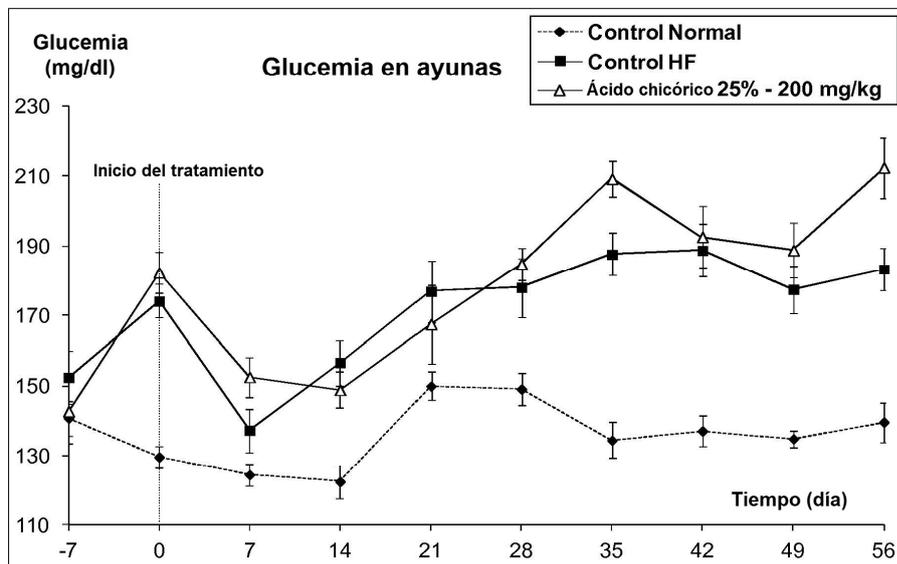


Figura 8

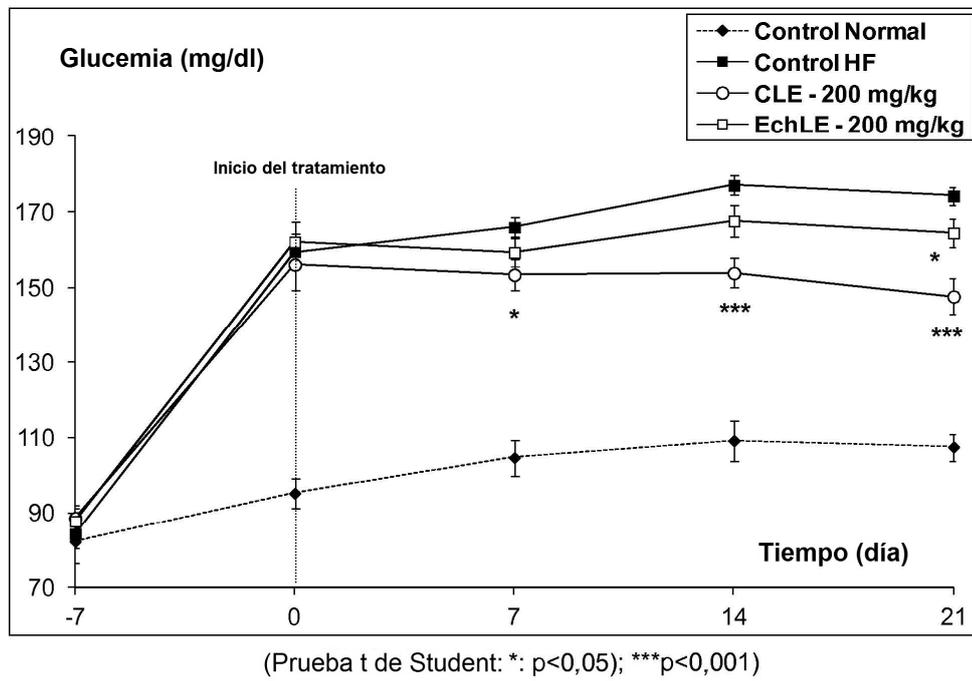
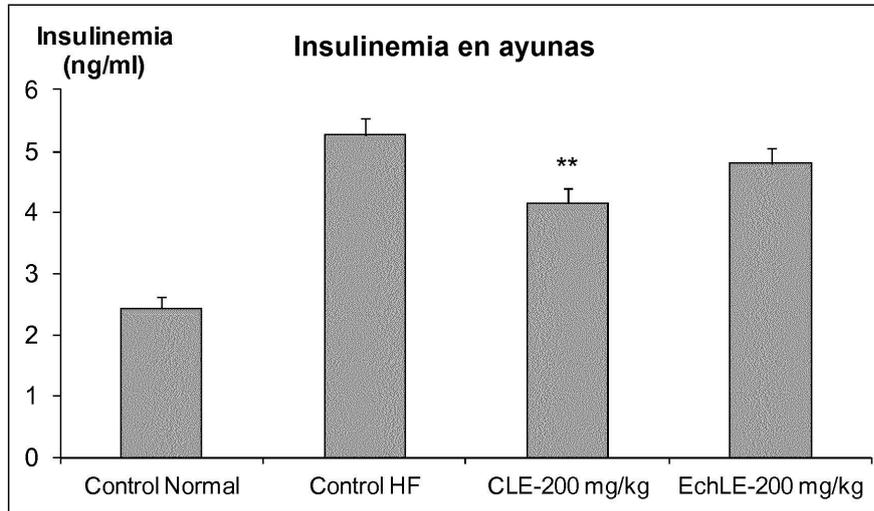
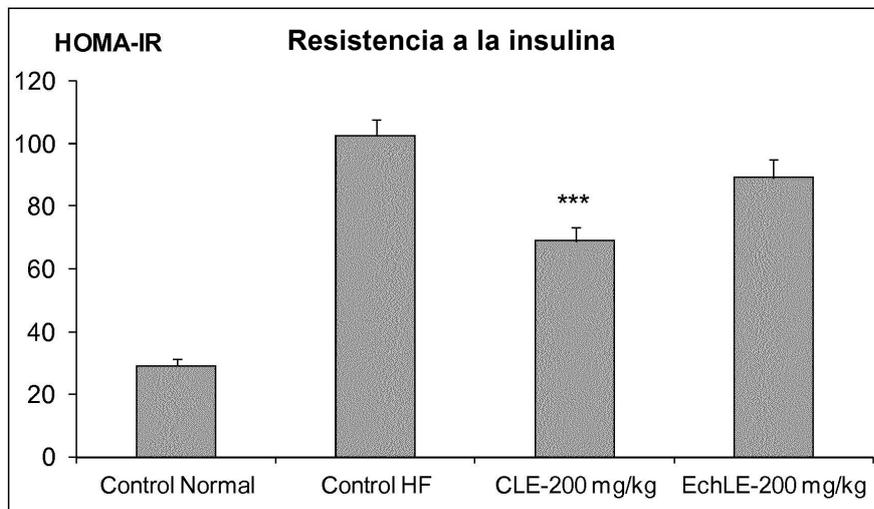


Figura 9



(Prueba t de Student: **p<0,01)



(Prueba t de Student: **p<0,001)

Figura 10