

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 729**

51 Int. Cl.:

A61K 36/22 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

A23L 33/105 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2015 E 15183167 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3009138**

54 Título: **Extracto de Mangifera para la gestión de la obesidad y/o el peso**

30 Prioridad:

01.09.2014 US 201462044398 P

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

24.01.2020

73 Titular/es:

**VIDYA HERBS PVT LTD (100.0%)
Plot No. 101, Jigani Industrial Estate, 2nd Phase,
Anekal Taluk
562106 Bangalore, IN**

72 Inventor/es:

KODIMULE, SHYAM PRASAD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 729 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 *Mangifera* para la gestión de la obesidad y/o el peso

Campo de la invención

5 La invención se refiere en general a composiciones de hierbas. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones de hierbas derivadas de *Mangifera indica* y métodos para su uso en el tratamiento y gestión de la obesidad y/o el peso.

Antecedentes

10 La obesidad es una afección que se manifiesta casi directamente como consecuencia de un estilo de vida moderno que abarca una cultura de trabajo sedentario, una dieta rica en calorías y alta en grasas, escasez de ejercicio regular o actividad física, adicción a sustancias adictivas como el tabaco y el alcohol y altos niveles de estrés diario. La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas en todo el mundo, con más de mil millones de adultos con sobrepeso, al menos 300 millones de ellos clínicamente obesos, y es un importante contribuyente a la carga mundial de enfermedades crónicas y discapacidad. La cardiopatía isquémica y las enfermedades cardiovasculares son las afecciones, a menudo denominadas enfermedades del estilo de vida, que tienen la obesidad como una de sus causas principales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cardiopatía isquémica es la causa número uno de muerte en el mundo hoy. Las enfermedades cardiovasculares (CVD) han acabado con casi 17 millones de personas en el año 2011, lo que equivale a 3 de cada 10 muertes. Las CVD se encuentran entre las principales causas de muerte, también en la India, según la OMS. La importancia de la gestión de la obesidad es, por lo tanto, evidente.

20 La obesidad, que a menudo coexiste en países en desarrollo con la desnutrición, es una afección compleja, con serias dimensiones sociales y psicológicas, que afecta a prácticamente todas las edades y grupos socioeconómicos. La obesidad y el sobrepeso representan un gran riesgo de otras enfermedades crónicas graves, como la diabetes tipo 2, la hipertensión, los accidentes cerebrovasculares y ciertas formas de cáncer. Las consecuencias para la salud van desde un mayor riesgo de muerte prematura hasta afecciones crónicas graves que reducen la calidad de vida en general.

25 Por lo tanto, es seguro afirmar que la gestión de la obesidad ayudaría sustancialmente a reducir la mortalidad global, aumentando la esperanza de vida y aumentando la calidad de vida. Los cambios en la dieta, el ejercicio y la actividad, el cambio de comportamiento, los medicamentos recetados para perder peso y la cirugía para perder peso son los brazos de tratamiento comunes para la gestión de la obesidad. El método de tratamiento que se vaya a adoptar a menudo depende de la elección preferida del individuo que se someta al tratamiento, así como del nivel de obesidad.

30 La modalidad de tratamiento preferida para perder peso es la dieta y el ejercicio físico. Sin embargo, debido a horarios ocupados y estilos de vida sedentarios, el seguimiento de los dos primeros métodos parece ponerse en práctica de una manera irregular. La cirugía de pérdida de peso, por otro lado, es descartada por una gran cantidad de personas debido a los altos costes que implica. Por lo tanto, hay un cambio gradual hacia un aumento en el uso de fármacos.

35 Los fármacos utilizados para bajar de peso generalmente alteran uno de los procesos fundamentales del cuerpo humano, tal como la regulación del peso al alterar el apetito, el metabolismo o la absorción de calorías. Orlistat es el único medicamento contra la obesidad que está aprobado para su uso a largo plazo por la FDA. Reduce la absorción de grasa intestinal mediante la inhibición de la enzima lipasa pancreática. Rimonabant y Sibutramina son los otros fármacos que inicialmente se aprobaron para el tratamiento de la obesidad, pero finalmente se prohibieron debido a problemas de seguridad. Debido a los posibles efectos secundarios, se recomienda que los fármacos contra la obesidad solo se receten para la obesidad, donde se espera que los beneficios del tratamiento superen su riesgo.

40 En vista de lo anterior, las intervenciones basadas en la nutrición se consideran una alternativa económica para ayudar a perder peso y gestionar el peso de una mejor manera. Los suplementos a base de hierbas medicinales, siendo rentables y con menos o ningún efecto secundario tóxico, se están utilizando ampliamente debido a su eficacia en la gestión de muchos trastornos crónicos.

45 Los autores de la presente descripción, por lo tanto, contemplan una composición de hierbas rentable y segura o un suplemento dietético que se utiliza para la gestión de la obesidad basados en el extracto de *Mangifera indica*. *Mangifera indica* es un gran árbol de hoja perenne perteneciente a la familia Anacardiaceae que es nativo de Asia tropical y se ha cultivado en el subcontinente indio durante más de 4.000 años. Los constituyentes químicos de la *Mangifera indica* siempre son de interés, especialmente los polifenoles, flavonoides y triterpenoides. Se ha informado de que la corteza contiene ácido protocatéquico, catequina, mangiferina, alanina, glicina, ácido γ -aminobutírico, ácido kínico, ácido shikímico, etc. El extracto de hojas de *Mangifera indica* reveló la presencia de esteroides, flavonoides, azúcar reductor y glucósidos cardíacos en el extracto de hexano; antraquinona, tanino y azúcar reductor en los extractos de acetato de etilo y saponina, esteroides, tanino, flavonoide, azúcares reductores y glucósidos cardíacos en los extractos metanólicos [Aiyelaagbe et al., 2009]. Se ha descubierto que la piel de la fruta es una buena fuente de fitoquímicos, tales como polifenoles, carotenoides, vitamina E y vitamina C [Ajila et al., 2007a].

5 La relativa complejidad bioquímica de la corteza del tallo y el extracto de la hoja de *Mangifera indica* pueden producir una acción pleiotrópica sobre varias dianas del metabolismo de los lípidos y los carbohidratos simultáneamente, lo que los convierte en terapias botánicas multifuncionales útiles en el control del peso. También pueden proporcionar herramientas bioquímicas eficaces para estudiar las complejas relaciones entre el balance energético, la adiposidad y la función endocrina [Moreno et al., 2005]. También, los extractos de piel y pulpa de la fruta del mango afectan a la adipogénesis en las células 3T3-L1 [Taing et al., 2012].

10 La mangiferina, es un constituyente bioactivo principal del glucósido de xantona, isomangiferina, taninos y derivados del ácido gálico [Shah et al., 2010]. Es una importante C-glucosilxantona de corteza del tallo, hojas, duramen, raíces y frutos de *M indica* [Wauthoz et al., 2007]. Se ha demostrado que la mangiferina, un polifenol natural, tiene un efecto hipolipidémico en rata y ratón [Guo et al., 2011]. La presencia de mangiferina en la composición de hierbas podría ser uno de los factores para la acción contra la obesidad. Por lo tanto, en vista de esta composición de hierbas que contiene extracto de *Mangifera indica* se evaluó su propiedad anti-obesidad.

Compendio de la invención

15 Es un objeto de la invención proporcionar una composición para su uso en la gestión de la obesidad en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un extracto de extracto de *Mangifera* en una cantidad eficaz para gestionar la obesidad y/o el peso en el sujeto.

Los sujetos de la invención son composiciones y usos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11.

20 El sujeto de la invención es una composición que comprende un extracto de extracto de *Mangifera* para su uso en el tratamiento de la obesidad, en donde el extracto es un extracto de corteza, hoja y piel de fruta de *Mangifera indica*. Como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" también se refiere a la prevención de la obesidad.

El sujeto de la invención es un uso no terapéutico de una composición que comprende un extracto de *Mangifera* para gestionar el peso en un sujeto, en donde el extracto es un extracto de corteza, hoja y piel de fruta de *Mangifera indica*, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz para gestionar el peso en el sujeto. El término "gestionar el peso" significa especialmente lograr la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso.

25 En algunos aspectos de la invención, la cantidad eficaz para gestionar la obesidad y/o el peso en el sujeto varía entre 50 y 500 mg/kg de peso corporal.

En algunos aspectos de la invención, la cantidad eficaz para gestionar la obesidad y/o el peso en el sujeto varía entre 50 y 500 mg/kg de peso corporal.

30 En algunos aspectos de la invención, gestionar la obesidad y/o el peso en el sujeto comprende disminuir al menos uno de el apetito, el aumento de peso corporal, el metabolismo y la absorción de calorías.

En algunos aspectos de la invención, la administración de la composición modula al menos uno de los niveles de insulina, los niveles de lipasa y la peroxidación lipídica.

En algunos aspectos de la invención, la administración de la composición modula al menos uno de la glucosa en suero, el colesterol total, los triglicéridos, los niveles de HDL-c y LDL-c.

35 En algunos aspectos de la invención, la composición comprende un extracto de corteza, hoja y piel de fruta de *Mangifera indica* a una razón 80:10:10 respectivamente.

En algunos aspectos de la invención, la composición comprende, en peso, 29% de flavonoides y 19% de polifenoles.

En algunos aspectos de la invención, la composición comprende, en peso, 22% de mangiferina, 4% de catequina, 3% de epicatequina y 0,4% de dihidrato de quercitina.

40 En algunos aspectos de la invención, la composición inhibe la superóxido dismutasa en el sujeto.

En algunos aspectos de la invención, la composición se administra en forma de polvo, píldora, comprimido, bolita, cápsula, película fina, solución, pulverización, jarabe, linctus, grajea, pastilla, goma de mascar, pasta, vapor, suspensión, emulsión, pomada, crema, loción, linimento, gel, gota, parche tópico, parche bucal, cuenta, gominola o inyección.

45 Es un objeto adicional de la invención proporcionar una composición para su uso en la gestión de la obesidad y/o para gestionar el peso en un sujeto, en donde la composición comprende, en peso, 22% de mangiferina, 4% de catequina, 3% de epicatequina y 0,4% de dihidrato de quercitina.

50 En algunos aspectos de la invención, la composición se formula en forma de polvo, píldora, comprimido, bolita, cápsula, película fina, solución, pulverizador, jarabe, linctus, grajea, pastilla, goma de mascar, pasta, vapor, suspensión, emulsión, pomada, crema, loción, linimento, gel, gota, parche tópico, parche bucal, cuenta, gominola o inyección.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra cromatogramas de HPLC de la composición de hierbas que muestran constituyentes fenólicos y flavonoides.

La Fig. 2 muestra un cromatograma de HPLC de una composición de hierbas que muestra el pico de mangiferina.

- 5 La Fig. 3 muestra la evaluación in vitro de la actividad de captación de H₂O₂, SOD, antioxidante, anti-lipasa, inhibidora de la peroxidación lipídica y anhídrido carbónico.

Definiciones

El término "aproximadamente", como se emplea en la siguiente memoria, se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% con respecto a una cantidad de referencia, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud. En realizaciones particulares, los términos "aproximadamente" o "de manera aproximada" cuando preceden a un valor numérico indican el valor más o menos un intervalo de 15%, 10%, 5% o 1%, o cualquier intervalo intermedio de los mismos.

15 Como se emplea en la siguiente memoria, la frase "material de *Mangifera indica*" se refiere al material de la planta de *Mangifera indica*, que es corteza, hojas y piel de fruta.

Como se emplea en la siguiente memoria, la frase "gestionar la obesidad" comprende tratar o prevenir la obesidad.

Memoria descriptiva detallada

La invención se refiere en general a composiciones de hierbas y métodos para su uso en una variedad de aplicaciones terapéuticas y preventivas. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones que comprenden extracto de *Mangifera indica* y métodos para su uso en la gestión de la obesidad y/o para gestionar el peso.

Las composiciones de hierbas de la presente invención pueden administrarse por diversas vías, que incluyen pero no se limitan a tópica, oral, bucal, sublingual, parenteral, rectal e inhalación. Las composiciones pueden estar en una forma de dosificación que incluye, pero no se limita a, polvo, píldora, comprimido, bolita, cápsula, película fina, solución, pulverizador, jarabe, linctus, gragea, pastilla, goma de mascar, pasta, vapor, suspensión, emulsión, pomada, crema, loción, linimento, gel, gota, parche tópico, parche bucal, cuenta, gominola, geles, soles, inyección y similares. Típicamente, la composición comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de hierbas de la presente invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones terapéuticas y preventivas. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de hierbas se utilizan en la administración, o se administran no terapéuticamente, a un sujeto para prevenir la oxidación (actividad antioxidante). En otras realizaciones de la invención, las composiciones de hierbas encuentran uso en el tratamiento, la prevención o la gestión de la obesidad y/o el peso. La frase "gestionar la obesidad y/o el peso", como se emplea en la siguiente memoria, se refiere a prevenir o reducir la grasa corporal, prevenir o reducir el aumento de peso, prevenir o reducir la absorción de grasa en la dieta, reducir el índice de masa corporal (IMC), reducir la grasa abdominal, evitar el aumento de peso de una dieta alta en grasas y combinaciones de los mismos. En realizaciones de la invención, las composiciones de hierbas se utilizan en administración, o se administran no terapéuticamente, en la gestión de afecciones hiperlipidémicas, que incluyen pero no se limitan a, reducir los lípidos de baja densidad, colesterol y triglicéridos en el suero, elevando los lípidos de alta densidad (HDL) y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones de la invención, las composiciones de hierbas se utilizan en administración, o se administran no terapéuticamente, para prevenir o reducir la acumulación de grasa en el hígado. En otras realizaciones, las composiciones de hierbas de la invención se utilizan en administración, o se administran no terapéuticamente, para reducir el estrés oxidativo o regular los niveles de glucosa en sangre. El término "reducir" como se emplea en la siguiente memoria se refiere a cualquier disminución medible que se produce como resultado de la administración de las composiciones de la invención, en relación con la ausencia de tal administración. Significativamente, las composiciones de la invención son no tóxicas y no mutagénicas. De manera similar, el término "incremento" o "aumento" se refiere a cualquier incremento medible que se produce como resultado de la administración de las composiciones de la invención, en relación con la ausencia de tal administración.

Un aspecto de la invención se refiere a partes de *Mangifera indica* que se utilizan en la preparación de la composición de hierbas. En consecuencia, la composición de hierbas se prepara a partir de corteza, hoja y piel de fruta de *Mangifera indica*. En otra realización más de la invención, las composiciones se preparan a partir de corteza, hojas y piel de fruta de *Mangifera indica* a una razón de aproximadamente 80:10:10 respectivamente.

Otro aspecto de la invención se refiere a la dosificación de la composición de hierbas que se utiliza. La dosificación de la composición dependerá de la naturaleza de la afección a tratar o gestionar, y del grado o progreso de la afección que se aborda. Algunos ejemplos no limitantes de dosificaciones para su uso con la invención incluyen 50-500 mg/kg de peso corporal. En un aspecto de la invención, la dosificación es de 500 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones descritas en la presente memoria pueden administrarse entre una y cuatro veces al día. En un aspecto de la invención,

la dosificación seleccionada se administra tres veces al día.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para elaborar las composiciones de hierbas sujeto. En algunos aspectos, las composiciones de hierbas están elaboradas mediante extracción con etanol. En otros aspectos de la invención, las composiciones se elaboran mediante extracción acuosa. En otras realizaciones más, las composiciones de la invención se preparan comprimiendo un material de *Mangifera indica*.

EJEMPLO 1 – PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE HOJAS

Se cortaron partes secas de corteza, hoja y piel de fruta de *Mangifera indica* (razón 80:10:10) en trozos pequeños, de aproximadamente 10 mm de longitud, para formar una masa de 100 kg. Esta masa se pulverizó para formar un polvo grueso en un molino de martillos y se apiló en un extractor 1.0 KL vertical. El extremo inferior del extractor contenía una placa perforada en la que se fijó una tela de filtración. La parte inferior del extractor se conectó a una entrada de la bomba de transferencia y la salida de la bomba de transferencia se conectó a un pliegue en T. Un extremo se conectó a la parte superior del extractor para la circulación de la masa de extracción durante el período de extracción y el otro extremo del pliegue en T se conectó a un tanque receptor.

El polvo grueso mencionado anteriormente se extrajo inicialmente con seis volúmenes de lecho de alcohol etílico del 70% v/v. La extracción se llevó a cabo a 75-78°C durante aproximadamente 7-8 horas con circulación continua del extracto con una bomba de transferencia. Una vez completada la extracción, el extracto se filtró a través de un filtro de vela SS de 5 micras y el extracto transparente resultante se recogió en un tanque receptor. El lecho se volvió a extraer añadiendo 4 volúmenes de lecho de alcohol etílico del 70% 3 veces más a una temperatura de 75-78°C durante aproximadamente 7-8 horas. Todos los extractos se recogieron a continuación en un tanque receptor y el extracto combinado se concentró en un reactor a vacío a 80-85°C hasta que el total de sólidos disueltos (TDS) de la masa del extracto alcanzó el 60-70%. La masa del extracto se secó adicionalmente en un secador de bandeja a vacío a 80-85°C hasta la finalización del secado. Se encontró que el rendimiento del extracto, la composición de hierbas (CH) era de $14 \pm 0,5\%$ p/p. El extracto se sometió adicionalmente a análisis fitoquímico a través de estimaciones espectrofotométricas y HPLC. Los estudios confirmaron que el CH está asociado con un buen porcentaje de constituyentes antioxidantes.

Tabla 1 Resultados del análisis fitoquímico.

Núm. muestra	Fito-constituyentes	Porcentaje	Método de análisis
1	Flavonoides totales	28,56± 0,93% p/p	Espectrofotometrico
2	Polifenoles totales	18,9± 1,8 %p/p	Espectrofotometrico

La composición de los flavonoides totales se determinó mediante el método de HPLC y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2 Composición de los flavonoides determinados

Núm. muestra	Constituyentes	Porcentaje
1	Mangiferina	21,5± 0,82% p/p
2	(+) - Catequina	3,84± 0,31% p/p
3	(-) - Epicatequina	2,67± 0,25% p/p
4	Dihidrato de quercetina	0,43± 0,06% p/p

La composición de los polifenoles totales se determinó mediante el método de HPLC y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3 Composición de los polifenoles determinados.

ES 2 738 729 T3

Núm. muestras	Constituyentes	Porcentaje
1	Ácido gálico	4,5± 0,42% p/p
2	Ácido 3,4-Dihidroxi benzoico	0,93± 0,23% p/p
3	Galato de metilo	1,2± 0,34% p/p
4	Galato de propilo	2,31± 0,73% p/p
5	Pirogalol	0,48± 0,08% p/p
6	Ácido parahidroxi benzoico	1,43± 0,07% p/p
7	Ácido vanílico	0,33± 0,06% p/p
8	Ácido siríngico	0,82±0,13% p/p
9	Ácido ferúlico	0,12± 0,02% p/p
10	Galato de etilo	0,76± 0,14% p/p
11	Ácido elágico	0,16± 0,05% p/p

Tabla 4 Tabla de picos que muestra fenoles y flavonoides en CH

Nombre	Tiempo ret.	Área	Altura	% Área	Lambda máx.
Mangiferina	3,936	1120914	479844	94,067	257/241/318/366/580
(+) - Catequina	7,598	58049	20738	9,623	203/278/366/657/622
(-) - Epicatequina	7,245	197931	62255	15,075	208/274/662/623
Dihidrato de quercetina	5,314	29209	12881	1,038	254/370/199
Ácido gálico	4,629	132932	36837	22,038	215/270/387/656/404
Ácido 3,4-dihydroxibenzoico	3,352	245290	75658	8,716	260/206/222/295/365
Galato de metilo	1,114	32395	13176	6,362	215/271
Galato de propilo	2,680	53767	15055	10,559	216/273
Pirogalol	0,598	37015	11721	100,000	202/257/240/315/362
Ácido parahidroxi benzoico	3,683	127757	54283	4,540	256/315/198
Ácido vanílico	1,269	4780	2177	0,939	204/260
Ácido siríngico	3,795	211448	79433	7,513	271/226
Ácido ferúlico	4,062	190504	74471	6,769	261/360

Nombre	Tiempo ret.	Área	Altura	% Área	Lambda máx.
Galato etilo	3,975	46246	17396	1,643	261/245
Ácido elágico	7,990	43005	18447	6,750	253/366/662/623

EJEMPLO 2 - ANÁLISIS UPLC PARA LA COMPOSICIÓN DE HIERBAS

Reactivos requeridos

- 5 Se adquirió Mangiferina (98% de pureza) de Sigma Aldrich. Los productos químicos requeridos para el análisis, acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), ácido fórmico, agua doblemente destilada fueron de grado LC.

Preparación de la solución

Se pesaron alrededor de 10 mg de CH en un matraz convencional de 10 ml. Se añadieron aproximadamente 3 ml de metanol del 70% (grado LC). La mezcla se sometió a sonicación durante 10 minutos y se completó hasta la marca con el mismo disolvente. La solución de muestra se filtró a través de un filtro de nylon de 0,20 µm.

- 10 Preparación del patrón

Se pesaron alrededor de 10 mg de patrón (98%) en un matraz convencional de 10 ml y se disolvieron en metanol del 70% (grado LC). La mezcla se sometió a sonicación durante 10 minutos, y se completó hasta la marca con el mismo disolvente. La solución de muestra se filtró a través de un filtro de nylon de 0,20 µm.

Análisis UPLC de la composición de hierbas

- 15 Se utilizó un método sensible y selectivo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) para el análisis de huella genética de la composición de hierbas. El sistema LC consistió en un sistema Shimadzu LC MS/MS núm. 8040. La columna utilizada fue SHIM-PACK XR-ODSIII, 5µm, 150 X 2,1 mm con fase móvil que consiste en ácido fórmico al 0,1% en agua de grado LCMS:acetonitrilo con sistema de gradiente isocrático en un tiempo de ejecución de 8 min. La velocidad de flujo se mantuvo a 0,35 ml / min a 25 ± 2°C. El producto eluido se controló a 254 nm. El tiempo de retención fue como se menciona en la Tabla 5.
- 20

Tabla 5 Condiciones cromatográficas optimizadas

Núm. muestra	PARÁMETROS	ESPECIFICACIÓN
1	Instrumento	LC MS/MS núm. 8040
2	Detector	SPD-M20A PDA
3	Fase móvil A:B	Ácido fórmico 0,1% en agua de grado LCMS: acetonitrilo
4	Columna	SHIM-PACK XR-ODSIII, 5µm, 150X 2,1 mm
5	Bomba	Nexera X2, LC-30AD Shimadzu
6	Longitud de onda	254 nm
7	Velocidad de flujo	0,35 mL / min
8	Volumen de inyección	1 µL
9	Tiempo de ejecución	8 min

Tabla 6 Tabla de picos que muestra mangiferina en la composición de hierbas

Nombre	Tiempo ret.	Área	Altura	% Área	Lambda máx.
Mangiferina	3,936	1120914	479844	94,067	257/241/318/366/580
Neo-mangiferina	4,195	70695	29923	5,933	259/243/319/364/579
Total		1191609	509767	100,00	

EJEMPLO 3 - EVALUACIÓN IN VITRO DE LA COMPOSICIÓN DE HIERBAS

Estudios de actividad antioxidante:

Actividad de captación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂):

5 Procedimiento:

La actividad de captación de peróxido de hidrógeno del CH se estimó en este estudio, donde inicialmente, las soluciones de CH se prepararon a diferentes concentraciones en agua destilada y las soluciones resultantes se mezclaron en una solución de 0,6 ml de H₂O₂ 40 mM preparada en tampón fosfato (0,1 M pH 7,4) e incubada durante 10 min. La absorbancia se midió a 230 nm frente a una solución blanco que contenía H₂O₂. Se repitió un procedimiento similar para CH, mangiferina y quercetina. La cantidad de radical peróxido de hidrógeno inhibido se calculó utilizando la siguiente ecuación. El resultado se expresa como % de actividad de captación de radicales de H₂O₂.

$$actividad\ de\ captación\ de\ radicales\ de\ H_2O_2 = \left\{ \frac{(Abs\ control - Abs\ muestra)}{(Abs\ control)} \times 100 \right\}$$

donde:

Abs control - Absorbancia de radicales de H₂O₂

15 Abs muestra - Absorbancia del extracto de muestra/patrón (CH, mangiferina y quercetina)

Observación:

Tabla 7 actividad de captación de H₂O₂

actividad de captación de H ₂ O ₂				
Muestras	Concentración en µg/ml			
	10	20	30	40
Quercetina (Patrón)	5,6	14,55	18,86	33,96
Mangiferina 98%	8,49	33,01	64,15	76,41
CH	16,43	19,17	53,42	75,34

Conclusión: La CH mostró buena actividad de captación de H₂O₂ en una manera dependiente de la concentración.

20 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD):

Procedimiento:

La actividad de captación de aniones superóxido de la CH se midió en esta prueba. Se mezclaron 1 ml (156 µM) de nitroazul de tetrazolio (NBT), 1 ml (468 µM) de dinucleótido de adenin nicotinamida (NADH) y 3 ml de la CH a una concentración de 100 µg/ml en tampón fosfato (pH 7,4). La reacción se inició mediante la adición de 100 µl de

25 metosulfato de fenazina (PMS) (0,18 mg/ml) y la mezcla se incubó a 25°C durante 5 minutos, seguido de la medición de la absorbancia a 560 nm. Se prepararon soluciones similares para la quercetina y la mangiferina y el porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula que se proporciona en la presente memoria a continuación; el resultado se

expresó como % de actividad de captación de la superóxido dismutasa.

$$\% \text{ de inhibición de la superóxido dismutasa} = \left\{ \frac{(Abs \text{ control} - Abs \text{ muestra})}{Abs \text{ control}} \times 100 \right\}$$

dónde:

Abs control - Absorbancia de control

5 Abs muestra - Absorbancia del extracto de muestra/patrón (CH, mangiferina y quercetina)

Observación:

Tabla 8 resultados de la actividad SOD

Actividad SOD	
Concentración de la muestra en µg/ml	% de inhibición
Quercetina(Patrón)	51,03
Mangiferina 98%	7,50
CH	83,40

Conclusión: La CH mostró una actividad SOD significativa en comparación con mangiferina 98% y quercetina.

10 Ensayo de antioxidante total:

Procedimiento:

15 La actividad antioxidante total de la CH se determinó mediante el método del fosfomolibdeno en el que se combinaron 0,3 ml de la CH (100 µg/ml) con 3 ml de una solución de reactivo (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sodio 28 mM y molibdato de amonio 4 mM). La mezcla de reacción resultante se incubó a 95°C durante 90 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución se midió a 695 nm frente a una solución blanco (agua). La capacidad antioxidante total se expresó como los miligramos equivalentes de ácido ascórbico.

Observación:

Tabla 9 Ensayo de antioxidante total

Ensayo de antioxidante total	
Concentración de la muestra µg/ml	mg de ácido ascórbico equivalente
Mangiferina 98%	31,23
CH	41,06

20 Conclusión: Se encontró que la capacidad antioxidante total de la CH era de 41,06 mg de ácido ascórbico equivalente. La CH mostró buena propiedad antioxidante. La capacidad antioxidante de la CH se confirmó a través de la actividad de captación de radicales peróxido de hidrógeno, la actividad de captación de radicales superóxido y la capacidad antioxidante total.

Estudios anti-obesidad *in vitro*:

25 Ensayo anti-lipasa:

Procedimiento:

Se preparó y emulsionó una suspensión que contenía 1% (V/V) de trioleína y 1% (V/V) de tween 40 en tampón fosfato 0,1 M (pH 8). El ensayo se inició mediante la adición de 800 µl de la emulsión de Trioleína a 200 µl de lipasa pancreática

porcina (0,5 g de lipasa pancreática en 15 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 8) y 200 µl del extracto de la CH (concentración de 100 µg/ml). La mezcla resultante se mezcló y la absorbancia se midió inmediatamente a 450 nm (T⁰). Las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 minutos y la absorción se midió a 450 nm (T³⁰).

$$\% \text{ de inhibición} = \left\{ \frac{A(\text{cont}) - A(\text{prueba})}{A(\text{cont})} \times 100 \right\}$$

5 dónde:

A (cont.) - es la absorbancia de control (T_C⁰-T_C³⁰)

A (prueba) - es la absorbancia de la muestra de prueba/patrón (T⁰-T³⁰) (CH, mangiferina y quercetina)

Observación:

Tabla 10 resultados del ensayo anti-lipasa

Ensayo anti-lipasa	
Concentración de la muestra: 1,2 mg/ml	% De inhibición
Orlistat	75,27
Mangiferina 98%	41,78
CH	42,30

10

Conclusión: La CH mostró buena propiedad anti-lipasa.

Ensayo de anhidrasa carbónica:

Procedimiento:

15 Se mezclaron independientemente CH a 250 µg/ml y Mangiferina 98% en 1,4 ml de tampón tris y 2,5 ml de anhidrasa carbónica. Las mezclas resultantes se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Después de la incubación, se añadió 1 ml de 4-NPA a las mezclas y se incubó adicionalmente durante 15-20 minutos a 37°C. La absorbancia de las mezclas de reacción se midió a 400 nm.

$$\% \text{ de inhibición} = \left\{ \frac{A(\text{cont}) - A(\text{prueba})}{A(\text{cont})} \times 100 \right\}$$

dónde:

20 A (cont.) - es la absorbancia de control

A (prueba) - es la absorbancia de la muestra de prueba/patrón

Observación:

Tabla 11 resultados de la prueba de anhidrasa carbónica

Anhidrasa carbónica	
Concentración de la muestra: 100 µg	% de inhibición
Mangiferina 98%	47,06
CH	52,31

25 Conclusión: La CH mostró una propiedad anti-lipasa mejorada en comparación con la Mangiferina.

Ensayo inhibidor de la peroxidación lipídica:

Procedimiento:

Se utiliza un ensayo modificado de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico ("TBARS", en sus siglas en inglés) (Ohkawa et al., 1979) para medir la peroxidación lipídica formada utilizando producto homogeneizado de yema de huevo como medio rico en lípidos (Ruberto et al., 2000).

- 5 Se toman 0,5 ml de producto homogeneizado de huevo (10% en agua destilada) y 0,1 ml de muestra de prueba en el intervalo de concentración 100-500 µg/ml en un tubo de ensayo y el volumen se completó hasta 1 ml añadiendo agua destilada. Finalmente, se añaden 0,05 ml de sulfato ferroso (0,07 M) a la mezcla anterior y se incuban durante 30 minutos para inducir la peroxidación lipídica. A continuación, se añaden 1,5 ml de ácido acético 20% (pH 3,5) y 1,5 ml de TBA (0,8% en SDS al 1,1%) y a continuación se añaden 0,05 ml de TCA (20%) en un baño de agua hirviendo durante 60 min. Después de enfriar, se añadirán 5 ml de butanol a todos los tubos de ensayo y se centrifugarán a 3.000 rpm durante 10 min. Se mide la absorbancia de la capa superior orgánica a 532 nm. El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica se calcula a partir de la fórmula,

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(Ab_{control} - Ab_{muestra \text{ de prueba}}) * 100}{Ab_{control}}$$

dónde:

- 15 Ab (cont.) - es la absorbancia de control

Ab (muestra de prueba) - es la absorbancia de la muestra de prueba/patrón

Tabla 12 Resultados de la prueba de ensayo inhibidor de la peroxidación lipídica

Ensayo inhibidor de la peroxidación lipídica	
Concentración de la muestra: 100-500µg/ml	% de inhibición
CH	56,52
Mangiferina 98%	74,9
Quercetina (Patrón)	53,44

- 20 Conclusión: La CH mostró una propiedad de peroxidación lipídica mejorada en comparación con la quercetina. La composición de hierbas posee una buena actividad hipolipidémica y anti-obesidad, que puede deberse a su potencial antioxidante y de captación de radicales libres.

Ejemplo de estudio de toxicidad oral aguda en ratas con la CH

- 25 La toxicidad oral de una sola dosis de la CH se evaluó en ratas Wistar albinas. Se realizó una prueba límite en la cual las ratas hembra recibieron una administración oral única de la CH a una dosis de 2.000 mg/kg de peso corporal. Después de la administración de la dosis, las ratas de la prueba límite se observaron diariamente y se pesaron semanalmente. Se realizó un examen de necropsia general en todos los animales de la prueba límite en el momento de la eutanasia programada (día 14). No se produjo mortalidad durante la duración de la prueba límite. Adicionalmente, no se observaron resultados internos importantes en la autopsia el día 14 del estudio.

- 30 Conclusión: En las condiciones de esta prueba, se estimó que la dosis letal oral aguda (DL₅₀) de la CH era mayor de 2.000 mg/kg en ratas.

Estudio de toxicidad oral en 28 días con dosis repetida de la CH

- 35 Se realizó un estudio de toxicidad oral durante 28 días con dosis repetida, con la CH en ratas seguido de un período de recuperación de 14 días. El objetivo del estudio fue evaluar la seguridad de la CH cuando se administra por vía oral a ratas hembra y macho. Otro objetivo fue determinar la toxicidad del órgano diana, el nivel de efecto no observado (NOEL) y la reversibilidad de los signos de toxicidad después del período de recuperación.

Las ratas Wistar hembra y macho se trataron con la CH 250, 500 y 1.000 mg/kg/p.c durante 28 días mediante sonda oral, seguido de un período de recuperación de 14 días.

Observaciones: 1) todos los animales macho y hembra de control y todos los grupos tratados con dosis hasta 1.000 mg/kg sobrevivieron durante el período de administración de dosis de 28 días y el período de recuperación de 14 días;

2) no se observaron signos de intoxicación en animales macho y hembra de diferentes grupos de dosis durante el período de administración de la dosis de 28 días y durante el período de recuperación de 14 días; 3) las ratas macho mostraron una disminución significativa en la ganancia de peso corporal con 250 y 500 mg/kg p.c. de la CH y en las hembras se observó una disminución significativa en la ganancia de peso corporal con 500 y 1.000 mg/kg p.c. de la CH en comparación con el control el día 29. Durante el período de reversión, los animales volvieron a la normalidad cuando se compararon con el grupo de reversión de control el día 43; 4) se encontró que el consumo de alimentos de los animales de control y tratados era comparable durante el período de dosificación de 28 días y el período de recuperación de 14 días; 5) el análisis hematológico realizado al final del período de dosificación el día 29 y al final del período de recuperación el día 43, no reveló anomalías atribuibles al tratamiento; 6) el análisis bioquímico realizado al final del período de dosificación el día 29 y al final del período de recuperación el día 43, no reveló cambios atribuibles al tratamiento, excepto que hubo un aumento significativo en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en ratas hembra tratadas con 250, 500 y 1.000 mg/kg/p.c. de la CH; 7) Las pruebas de la batería de observaciones funcionales realizadas al finalizar, no revelaron anomalías; 8) el análisis de orina, realizado al final del período de dosificación en la semana 4 y al final del período de recuperación en la semana 6, no reveló ninguna anomalía atribuible al tratamiento; 9) se encontró que los datos de peso de órganos de machos y hembras sacrificados al final del período de dosificación y al final del período de recuperación eran comparables con los de los controles respectivos, el examen patológico general no reveló ninguna anomalía; el examen histopatológico no reveló ninguna anomalía importante, excepto la congestión de los vasos sanguíneos en pocos órganos.

Conclusión: Basándose en los descubrimientos anteriores, se encontró que el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) de la CH era de 1.000 mg/kg/p.c. tanto para ratas Wistar macho como hembra, cuando se administró por vía oral durante 28 días seguidos de un período de recuperación de 14 días.

EJEMPLO 4 - ACTIVIDAD ANTI-OBESIDAD DE LA CH CON RESPECTO (VRT) AL PATRÓN:

Objetivo: El objetivo fue investigar el efecto de la CH contra ratas alimentadas con dieta rica en grasas.

Procedimiento:

Animales: Ratas Wistar macho (160 a 200 g); Núm. de animales: 36; Alojamiento: 3/jaula, ciclo luz/oscuridad 12 horas; Temperatura: 25 ± 2°C;

Modelo y composición de la dieta: dieta rica en grasas en ratas: 25% de manteca de cerdo, 5% de aceite de soja; 5% de almidón; 65% de alimento para ratas normal disponible comercialmente;

Grupos: las ratas Wistar macho se dividieron en seis grupos con seis animales en cada grupo

30

Grupo	Dieta
Grupo 01:	Alimentación normal + Vehículo (agua destilada)
Grupo 02:	Dieta con alto contenido de grasas
Grupo 03:	Dieta con alto contenido de grasas + fármaco de referencia (Orlistat 30 mg/kg)
Grupo 04:	Dieta con alto contenido de grasas + CH (50 mg/kg)
Grupo 05:	Dieta con alto contenido de grasas + CH (100 mg/kg)
Grupo 06:	Dieta con alto contenido de grasas + CH (150 mg/kg)

Observaciones:

Efecto de la CH en el aumento de peso corporal en ratas macho

Tabla 13 Resultados del efecto de la CH en el aumento de peso corporal en ratas macho

ES 2 738 729 T3

Grupos	Peso final	Peso inicial	Diferencia en el aumento de peso corporal.
Grupo I	251,70±2,02	181,70±1,99	70,00±2,60
Grupo II	292,50±1,81	181,50±1,31	111,0±2,20****a
Grupo III	261,80±2,53	182,00±0,96	79,82±2,58****b
Grupo IV	254,80±1,87	182,30±1,99	72,43±3,16****b
Grupo V	250,50±2,53	183,30±0,88	67,15±2,75****b
Grupo VI	259,20±6,06	184,70±0,80	74,50±5,77****b

Los valores se expresan en términos de ETM ± Media. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett.

Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo de dieta con alto contenido de grasa. *** P <0,001.

Conclusión: La CH a todas las dosis mostró una reducción significativa (P <0,001) en el aumento de peso corporal en comparación con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

Efecto de la CH en la ingesta media de alimentos en ratas macho

5

Tabla 14 Resultados del efecto de la CH en la ingesta de alimento media en ratas macho

Grupos	Ingesta de alimento media g/rata
Grupo I	17,21±0,38
Grupo II	13,56±0,36****a
Grupo III	13,45±0,28 ^{nsb}
Grupo IV	12,13±0,24**b
Grupo V	11,26±0,24****b
Grupo VI	13,18±0,31 ^{nsb}

Los valores se expresan en términos de ETM ± Media. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett.

Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

*** P <0,001 *** P <0,001 ** P <0,01 ^{ns} no significativo

Conclusión:

La CH a 50 y 100 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,01, P <0,001) en la ingesta de alimentos en

comparación con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

Efecto de la CH en el peso del órgano del hígado y mesentérico, tejido adiposo marrón (BAT), almohadillas de grasa perirrenal y almohadilla grasa epididimal.

5 Tabla 15 Resultados del efecto de la CH en el peso del órgano del hígado y mesentérico, tejido adiposo marrón (BAT), almohadillas de grasa perirrenal y almohadilla grasa epididimal

Grupos	Hígado	Grasa mesentérica	BAT	Tejido de almohadilla perirrenal		Almohadilla grasa epididimal	
				Derecha	Izquierda	Derecha	Izquierda
Grupo I	2,8±0,01	0,59±0,02	0,13±0,01	0,25± 0,02	0,21± 0,01	0,38± 0,01	0,33± 0,02
Grupo II	3,5±0,15 ****a	1,14±0,07 ****a	0,30±0,01****a	1,05± 0,13****a	1,07± 0,11****a	0,63± 0,04****a	0,56± 0,05****a
Grupo III	2,8±0,08 ***b	1,02±0,07 nsb	0,28± 0,01 ^{nsb}	0,77±0,08 ^{nb}	0,77± 0,08 ^{nb}	0,55± 0,02 ^{nsb}	0,52± 0,03 ^{nsb}
Grupo IV	2,7±0,07 ***b	0,80±0,03 **b	0,17± 0,01***b	0,49± 0,01***b	0,44± 0,03***b	0,51± 0,01 ^{nb}	0,42± 0,01 ^{nb}
Grupo V	2,8±0,03 ***b	0,83±0,03 **b	0,17± 0,01***b	0,47±0,02***b	0,67±0,02***b	0,51± 0,02 ^{nb}	0,39± 0,02***b
Grupo VI	2,9±0,02 ***b	0,84±0,03 **b	0,17±0,01***b	0,63±0,07**b	0,69±0,04**b	0,51± 0,02 ^{nb}	0,42± 0,03 ^{nb}

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett. Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

*** P <0,001 ** P <0,01 * P <0,05 ^{ns} no significativo

Conclusión: La CH a todas las dosis mostró una reducción significativa (P <0,001) en el peso del órgano del hígado, almohadillas de grasa perirrenal y BAT, grasa mesentérica (P <0,001), almohadilla grasa epididimal (P <0,05) en comparación con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

10 Efecto de la CH en los niveles de glucosa en suero, colesterol total, triglicéridos, HDL-c y LDL-c (mg/dL)

Tabla 16 Resultados del efecto de la CH en los niveles de glucosa en suero, colesterol total, triglicéridos, HDL-c y LDL-c (mg/dL)

Grupos	Glucosa	Colesterol total	Triglicéridos	HDL-c	LDL-c
Grupo I	81,63±2,96	47,53±1,15	52,61±2,14	22,61±0,56	14,40±1,51
Grupo II	114,20±7,63****a	61,39±2,47****a	104,6±4,16****a	17,27±0,51****a	23,20±2,96 ^a
Grupo III	92,00±2,89**b	50,91±0,62***b	79,96±1,13***b	21,72±1,22**b	13,20±1,71**b
Grupo IV	96,23±2,72 ^b	48,96±1,90***b	71,48±5,42***b	23,77±0,99***b	10,89±1,02***b

ES 2 738 729 T3

Grupos	Glucosa	Colesterol total	Triglicéridos	HDL-c	LDL-c
Grupo V	82,37±2,82 ^{***b}	48,93±2,23 ^{***b}	55,92±2,03 ^{***b}	24,97±0,87 ^{***b}	12,77±1,75 ^{***b}
Grupo VI	96,70±0,96 ^{*b}	52,55±1,42 ^{**b}	79,77±5,3 ^{***b}	24,25±0,48 ^{***b}	12,35±2,13 ^{**b}

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett. Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

*** P <0,001 ** P <0,01 * P <0,05

Conclusión:

La CH a 50 y 150 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,05), a 100 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,01) en los niveles de glucosa en comparación con el grupo con dieta con alto contenido de grasas. La CH a 50 y 100 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,001), a 150 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,01) en los niveles de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en comparación con el grupo con dieta con alto contenido de grasas. La CH a todas las dosis mostró una reducción significativa (P <0,001) en los triglicéridos totales y un aumento en los niveles de HDL cuando se comparó con el grupo con dieta con alto contenido de grasas (Grupo II).

10 Efecto de la CH en el índice aterogénico.

Tabla 17 Resultados del efecto de la CH en el índice aterogénico.

Grupo	Índice aterogénico
Grupo I	1,11±0,08
Grupo II	2,57±0,18 ^{***a}
Grupo III	1,39±0,15 ^{***b}
Grupo IV	1,07±0,06 ^{***b}
Grupo V	0,96±0,06 ^{***b}
Grupo VI	1,17±0,08 ^{***b}

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett. Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo con dieta con alto contenido de grasas. *** P <0,001

Conclusión: La CH a todas las dosis mostró una reducción significativa (P <0,001) en el índice aterogénico cuando se comparó con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

15 Efecto de la CH en los niveles de triglicéridos en hígado.

Tabla 18 Resultados del efecto de la CH en los niveles de triglicéridos en hígado

ES 2 738 729 T3

Grupo	Triglicéridos en hígado
Grupo I	63,85±0,42
Grupo II	96,47±1,67***a
Grupo III	87,77±2,28* ^b
Grupo IV	78,57±1,93*** ^b
Grupo V	86,47±2,11** ^b
Grupo VI	85,46±2,31** ^b

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett. Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

*** P <0,001 ** P <0,01 * P <0,05

Conclusión: La CH a 50 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,001), a 100 y 150 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,01) en los niveles de triglicéridos en hígado cuando se comparó con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

5 Efecto de la CH en los niveles hormonales de insulina.

Tabla 19 Resultados del efecto de la CH en los niveles hormonales de insulina.

Grupo	Insulina (mU/L)
Grupo I	0,27±0,023
Grupo II	0,15±0,008***a
Grupo III	0,15±0,005 ^{nsb}
Grupo IV	0,14±0,005 ^{nsb}
Grupo V	0,22±0,016* ^b
Grupo VI	0,23±0,021** ^b

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett. Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

*** P <0,001 ** P <0,01 * P <0,05 ^{ns} no significativo

Conclusión: La CH a 100 y 150 mg/kg p.c. mostró un aumento significativo (P <0,05, P <0,01 respectivamente) en los

niveles de insulina cuando se comparó con el grupo con dieta con alto contenido de grasas (Grupo II).
Efecto de la CH en la estimación de ácidos grasos fecales.

Tabla 20 Efecto de la CH en la estimación de ácidos grasos fecales.

Grupo	Estimación de ácidos grasos fecales
Grupo I	1,0±0,05
Grupo II	3,3±0,13 ^{***a}
Grupo III	4,1±0,26 ^b
Grupo IV	2,3±0,13 ^{**b}
Grupo V	2,4±0,26 ^{**b}
Grupo VI	3,1±0,26 ^{nsb}

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *t* de Dunnett. Número de animales en cada grupo n = 6.

^aComparación realizada con el grupo de control.

^bComparación realizada con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

*** P <0,001 ** P <0,01 * P <0,05 ^{ns} no significativo

5

Conclusión: La CH a 50 y 100 mg/kg p.c. mostró una reducción significativa (P <0,01) en los ácidos grasos fecales cuando se comparó con el grupo con dieta con alto contenido de grasas.

por lo tanto, los estudios anti-obesidad *in vivo* de la CH revelaron los siguientes resultados.

La Composición de hierbas:

- 10
 - reduce la ganancia de peso corporal,
 - reduce la ingesta de alimentos
 - elimina el tejido adiposo abdominal
 - causa termogénesis
 - mejora los niveles de HDL.
- 15
 - restaura los niveles de glucosa
 - tiene protección del hígado.

EJEMPLO 5 - ESTUDIOS CLÍNICOS DE COMPOSICIÓN DE HIERBAS

Se llevó a cabo un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar la eficacia y seguridad de los comprimidos de CH para reducir el peso corporal en pacientes obesos.

- 20 Se incluyó en el estudio un número total de 30 de sujetos según los criterios de inclusión. Los sujetos fueron asignados al azar y se asignó un número igual de sujetos en el grupo A de tratamiento con CH y en el grupo B de tratamiento con placebo. El estudio clínico realizado durante 56 días en la Policlínica Sampoorna HealthCare y Amruth, Bangalore, India. El estudio se realizó en cumplimiento con la Declaración de Helsinki, 2002. El protocolo y el formulario de consentimiento informado del paciente fueron revisados y aprobados por los comités de ética independientes apropiados de Policlínica Sampoorna HealthCare y Amruth antes del inicio del estudio. Los sujetos recibieron un
- 25 tratamiento durante 56 días y se examinaron en las semanas 0, 2, 4, 8 del estudio. Los voluntarios realizaron un

5 seguimiento durante las dos semanas posteriores al período de tratamiento que fue la 10ª semana del estudio. En la
 10 semana 0ª, se examinó a los sujetos para examen físico, mediciones antropométricas, evaluación de la calidad de
 vida y múltiples pruebas de laboratorio que incluyen parámetros bioquímicos, mediciones de HbA1c y parámetros de
 hematología como datos de referencia. Durante la 2ª y 4ª visitas Se informó sobre mediciones antropométricas, el
 examen físico y cualquier evento adverso. En la visita de la 8ª semana, se registraron exámenes físicos, mediciones
 antropométricas, perfil de lípidos, glucosa en sangre en ayunas, HbA1c, evaluación de la calidad de vida, eventos
 adversos, medicamentos concomitantes. Todos los sujetos fueron aconsejados para el cumplimiento de la dieta y el
 ejercicio en cada visita. La visita de la 10ª semana estaba destinada a examinar los signos vitales, el examen físico,
 el registro de los efectos adversos o los eventos adversos graves, los medicamentos concomitantes, el peso, el IMC
 y la circunferencia de la cintura, la razón cintura-cadera y la razón cintura-altura. Se pidió a los sujetos que tomaran
 un comprimido que contenía 500 mg de CH o placebo tres veces al día durante 08 semanas antes del desayuno y las
 comidas.

Tabla 21 Resultado primario y secundario del grupo tratado con CH

Núm.	Parámetros	Visita 1	Visita 4	Diferencia en %
1	Peso corporal (kg)	82,5±12,3	77,25±12,9	6,36
2	Índice de masa corporal (IMC kg/m ²)	30,96±1,76	28,92±2,0	6,59
3	Circunferencia de la cintura (cm)	101,25±6,67	94,92±5,9	6,25
4	Circunferencia de la cadera (cm)	106,33±2,05	101,91±1,67	4,16
5	Triglicéridos (mg/dL)	168,5±73,56	143,83±46,13	14,64
6	Colesterol (mg/dL)	214,08±33,2	187,91±21,2	12,22
7	LDL (mg/dL)	138,27±34,9	104,33±25,73	24,55
8	VLDL (mg/dL)	33,7±14,71	28,76±9,22	14,66
9	HDL	42,1±8,4	54,81±5,2	30,19

15 Tabla 22 Resultado primario y secundario del grupo tratado con placebo.

Núm.	Parámetros	Visita 1	Visita 4	Diferencia en %
1	Peso corporal (kg)	85,5±10,9	84,95±10,88	0,643
2	Índice de masa corporal (IMC kg/m ²)	32,33±1,88	32,04±1,81	0,90
3	Circunferencia de la cintura (cm)	104,79±5,36	104,42±5,33	0,35
4	Circunferencia de la cadera (cm)	108,83±1,70	108,46±1,73	0,34
5	Triglicéridos (mg/dL)	188,5±75,4	185,75±74,68	1,46
6	Colesterol (mg/dL)	204,91±43,8	201,16±43,2	1,83
7	LDL (mg/dL)	108,85±59,7	107,75±59,16	1,01
8	VLDL (mg/dL)	37,7±15,08	37,15±14,93	1,46

ES 2 738 729 T3

Núm.	Parámetros	Visita 1	Visita 4	Diferencia en %
9	HDL	41,92±4	41,93±3,52	0,02

Los datos clínicos sugieren que la CH es segura y ha demostrado una eficacia significativa para reducir el peso corporal y otras complicaciones relacionadas con la obesidad.

Referencias

1. OECD Guideline for the testing of chemicals- Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents; TG 408, 21 Septiembre 1998.
2. OECD Guideline No. 420, "Acute Oral Toxicity" -Fixed Dose Procedure 17 Diciembre 2001.
- 5 3. Chougule A., Manjunath A. (2012), Anti-obesity drugs of Bhava prakasha nighantu: The literary survey. IJRAP, 3 (5), 650-654.
4. Juliana Aparecida Severi, Zeila Pinheiro Lima, Hélio Kushima, Alba Regina Monteiro Souza Brito, Lourdes Campaner dos Santos, Wagner Vilegas, Clélia Akiko HirumaLima (2009) Polyphenols with Antiulcerogenic Action from Aqueous Decoction of Mango Leaves (*Mangifera indica* L.). *Molecules*, 14, 1098-1110.
- 10 5. Taing M.W., Pierson J-T, Hoang V.L. T., Shaw P. N., Dietzgen R. G., Gidley M. J., Sarah J. Thomson R, Monteith G. R. (2012) Mango fruit peel and flesh extracts affect adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Food Funct.*, 3, 828-836.
6. Moreno, D. A., Ripoll, C., Ilić, N., Poulev, A., Aubin, C., Raskin, I. (2005) Inhibition of lipid metabolic enzymes using *Mangifera indica* extracts. *J. Food Agric. & Environ.*, Vol. 4(1): 21-26.
- 15 7. Ajila, C. M., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (2007a). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102, 1006-1011.
8. Aiyelaagbe O.O., Osamudiamen P. M. (2009) Phytochemical Screening for Active Compounds in *Mangifera indica* Leaves from Ibadan, Oyo State *Plant Sciences Research*, 2(1), 11-13.
9. Shah K.A., Patel M.B., Patel R.J., Parmar P.K. (2010) *Mangifera Indica* (Mango). *Phcog. Rev.*, 4(7),42-48
- 20 10. Wauthoz N., Balde A. Balde E. S., Damme M. V., Duez P. (2007) Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. Bark and Pharmacological Studies of its Main C-Glucosylxanthone, Mangiferin. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 112-119.
11. Singh S. K., Sinha S. K., Prasad S.K., Kumar R., Bithu B. S., Kuma S. S., Singh P. (2011) Synthesis and evaluation of novel analogues of mangiferin as potent antipyretic. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 866-869.
- 25 12. Gabino Garrido, Idania Rodeiro, Ivones Hernández, Gastón García, Gema Pérez, Nelson Merino, Alberto Núñez-Sellés, René Delgado (2009) In vivo acute toxicological studies of an antioxidant extract from *Mangifera indica* L. (*Vimang*),32(1),53-8.
13. Fuchuan Guo, Conghui Huang, Xilu Liao, Yemei Wang, Ying He, Rennan Feng, Ying Li, Changhao Sun (2011) Beneficial effects of mangiferin on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(12), 1809-18.

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un extracto de Mangifera para su uso en el tratamiento de la obesidad, en donde el extracto es un extracto de corteza, hoja y piel de fruta de Mangifera indica.
- 5 2. Un uso no terapéutico de una composición que comprende un extracto de Mangifera para gestionar el peso en un sujeto, en donde el extracto de Mangifera es un extracto de corteza, hoja y piel de fruta de Mangifera indica.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde el extracto de Mangifera está presente en una cantidad de 500 mg.
4. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes para alterar al menos uno de apetito, aumento de peso corporal, metabolismo o absorción de calorías.
- 10 5. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes para modular al menos uno de niveles de insulina, niveles de lipasa y peroxidación lipídica.
6. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes para modular al menos uno de niveles de glucosa en suero, colesterol total, triglicéridos, HDL-c y LDL-c.
- 15 7. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde el extracto de corteza, hoja y piel de fruta de Mangifera indica es un extracto corteza, hoja y piel de fruta de Mangifera indica a una razón 80:10:10 respectivamente.
8. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende, en peso, 29% de flavonoides y 19% de polifenoles.
- 20 9. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende, en peso, 22% de mangiferina, 4% de catequina, 3% de epicatequina y 0,4% de dihidrato de quercitina.
10. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición inhibe la superóxido dismutasa en el sujeto.
- 25 11. La composición para el uso o el uso de al menos una de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es un polvo, píldora, comprimido, bolita, cápsula, película fina, solución, pulverizador, jarabe, linctus, gragea, pastilla, goma de mascar, pasta, vapor, suspensión, emulsión, pomada, crema, loción, linimento, gel, gota, parche tópico, parche bucal, cuenta, gominola o inyección.

Fig. 1a

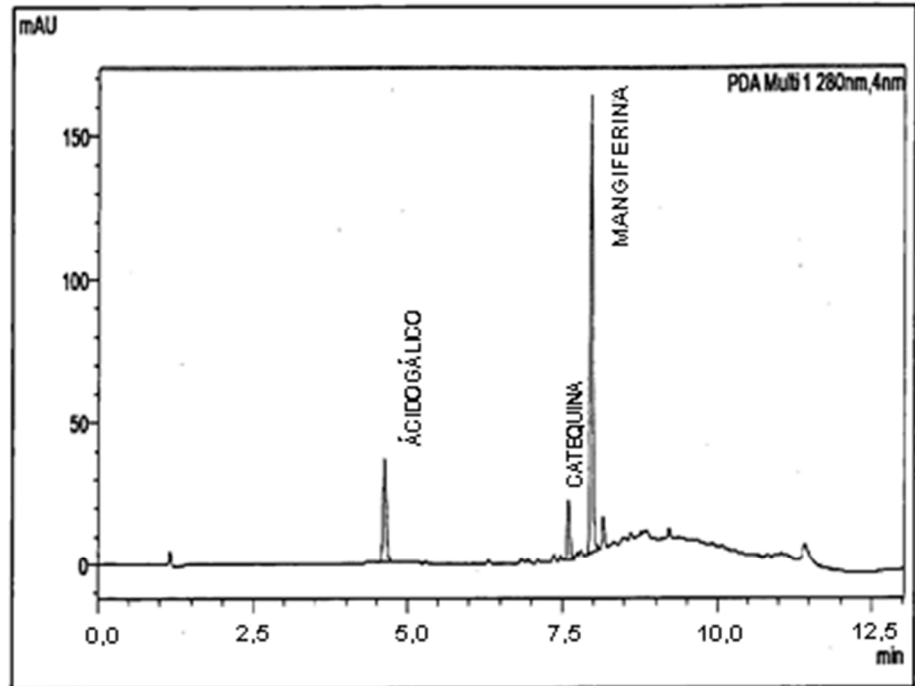


Fig 1b

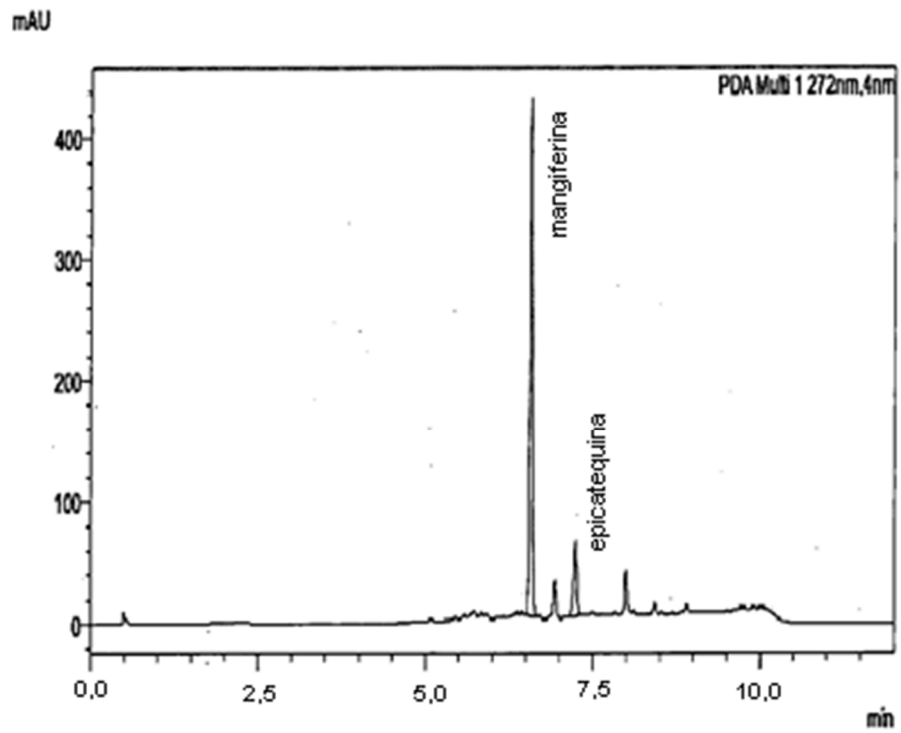


Fig. 1c

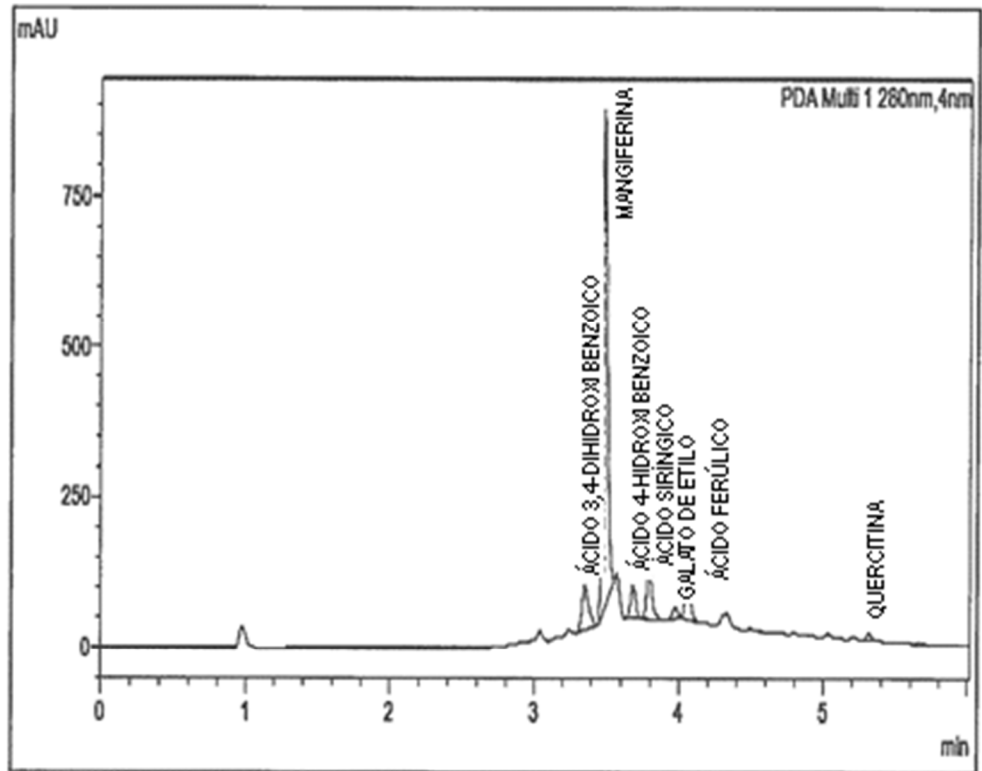


Fig 1d

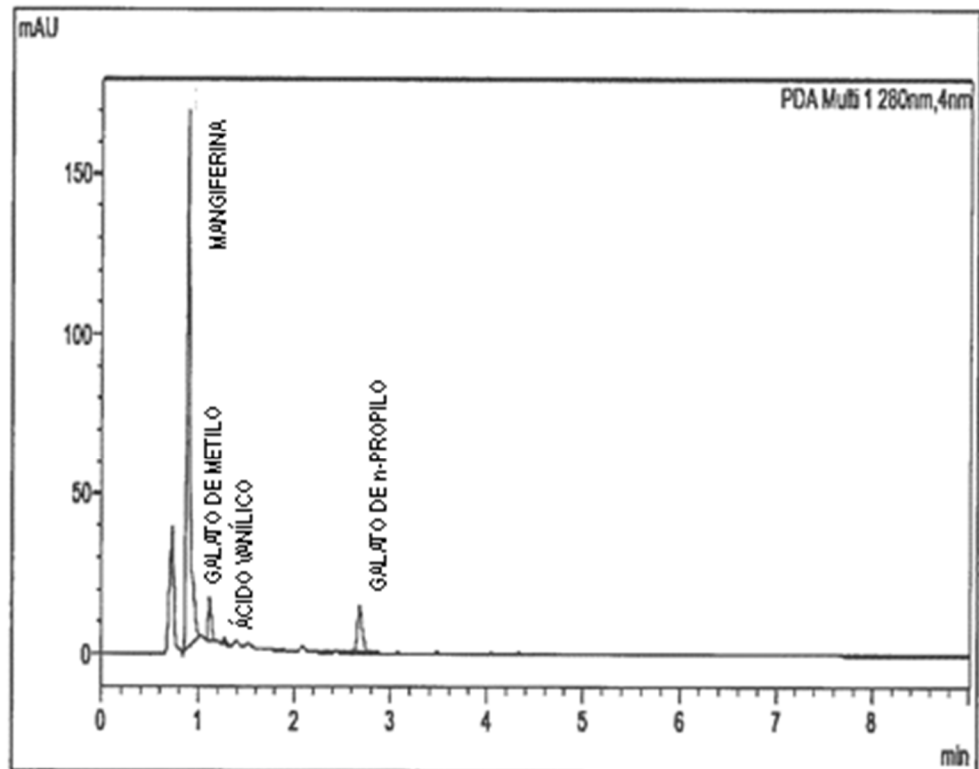


Fig. 1e

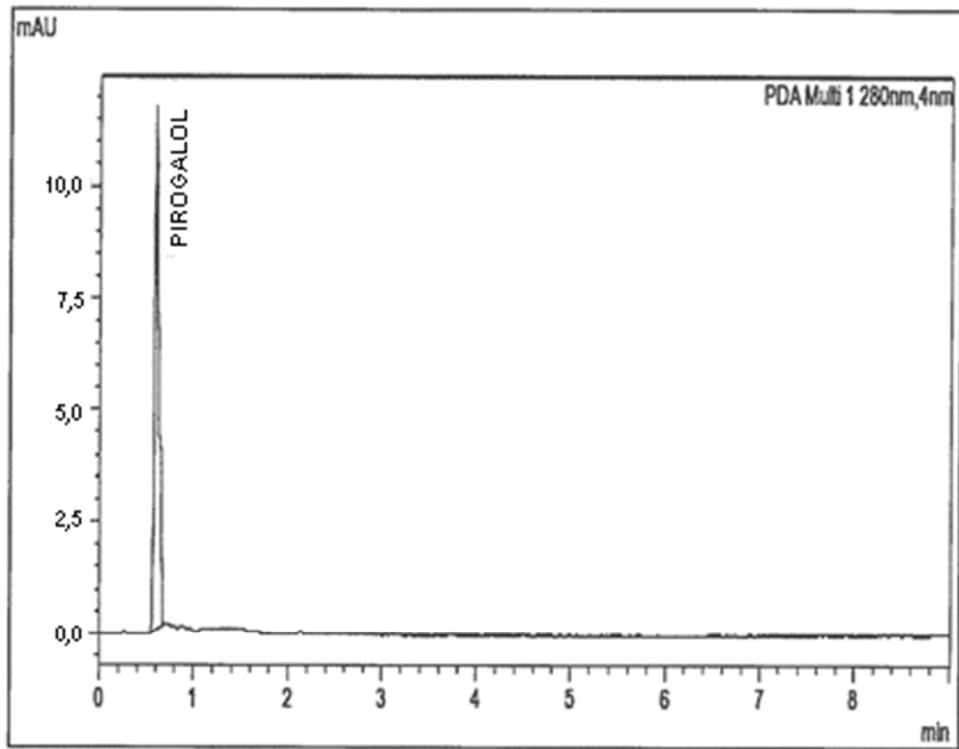


Fig. 1f

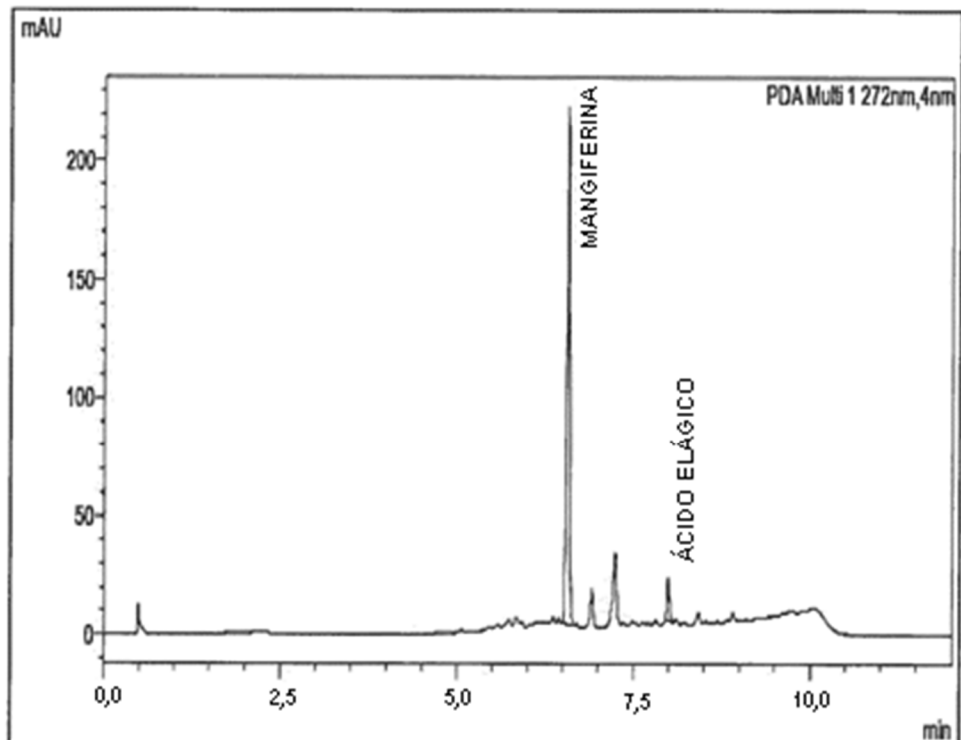


FIG. 2

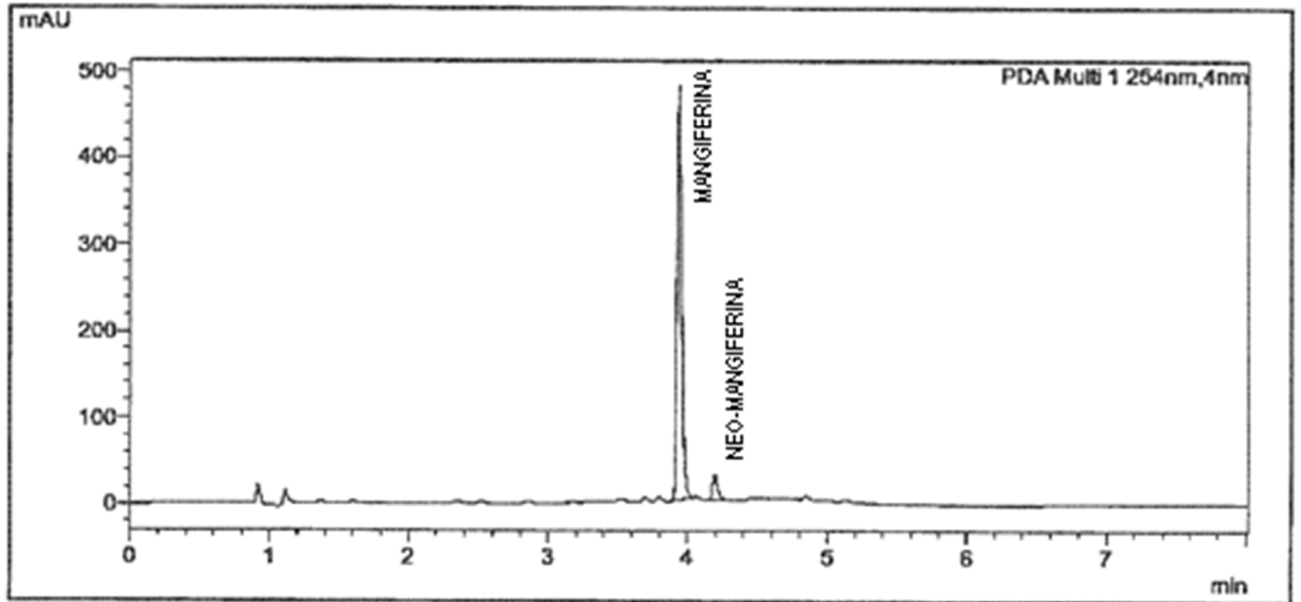


Fig. 3a

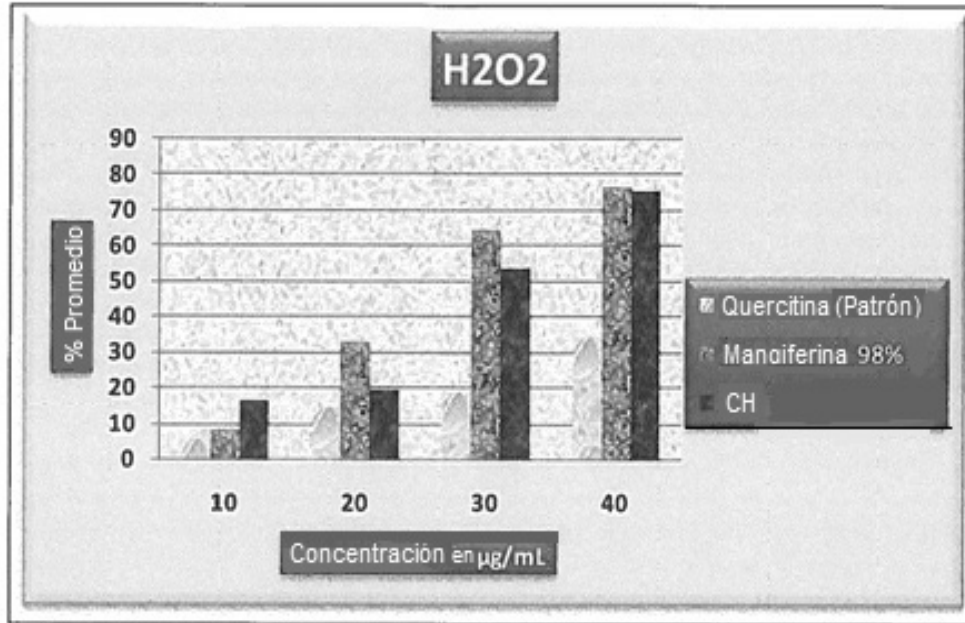


Fig 3b

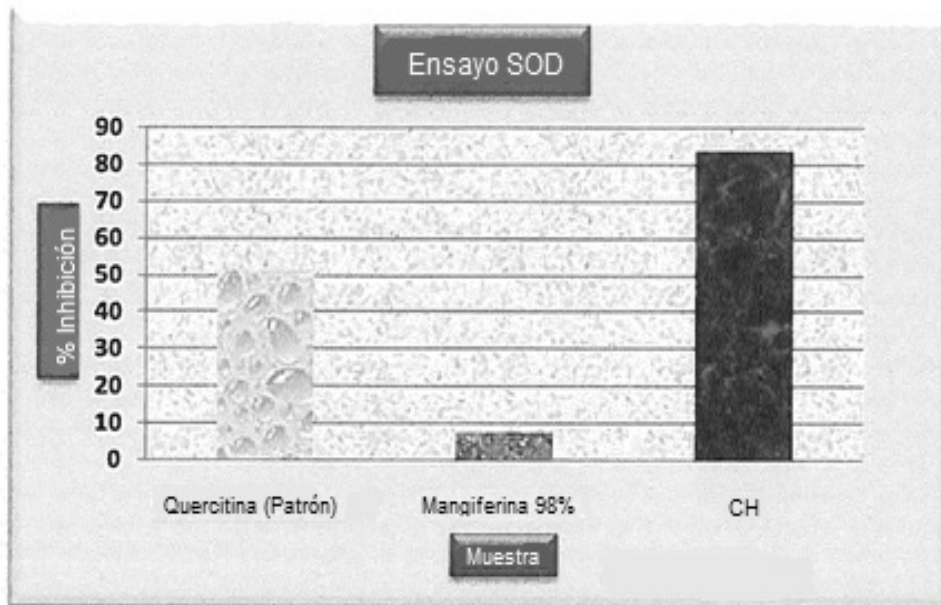


Fig. 3c

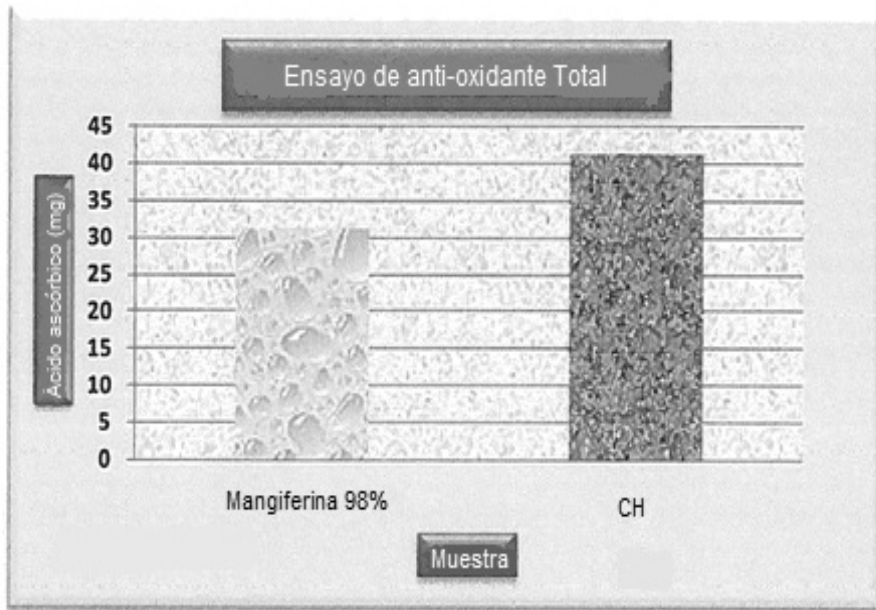


Fig 3d

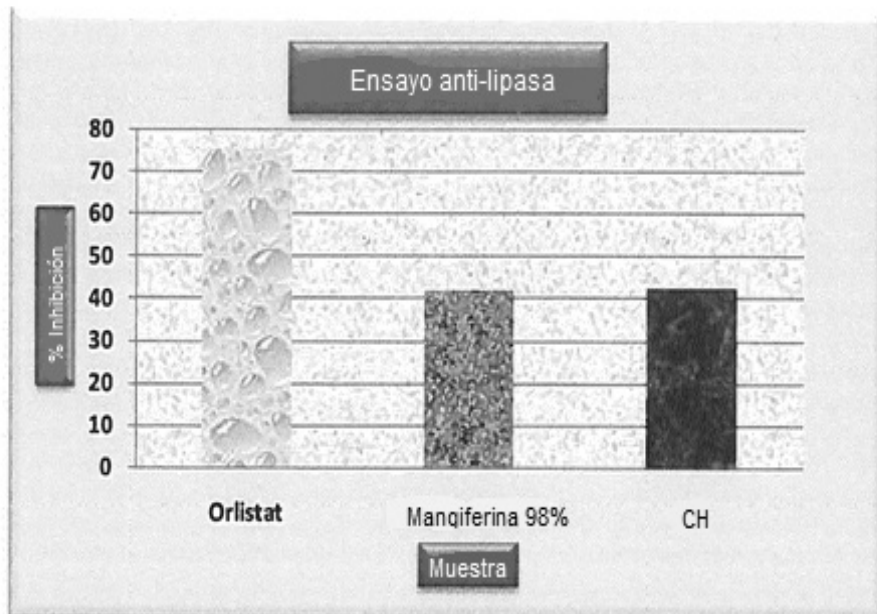


Fig. 3e

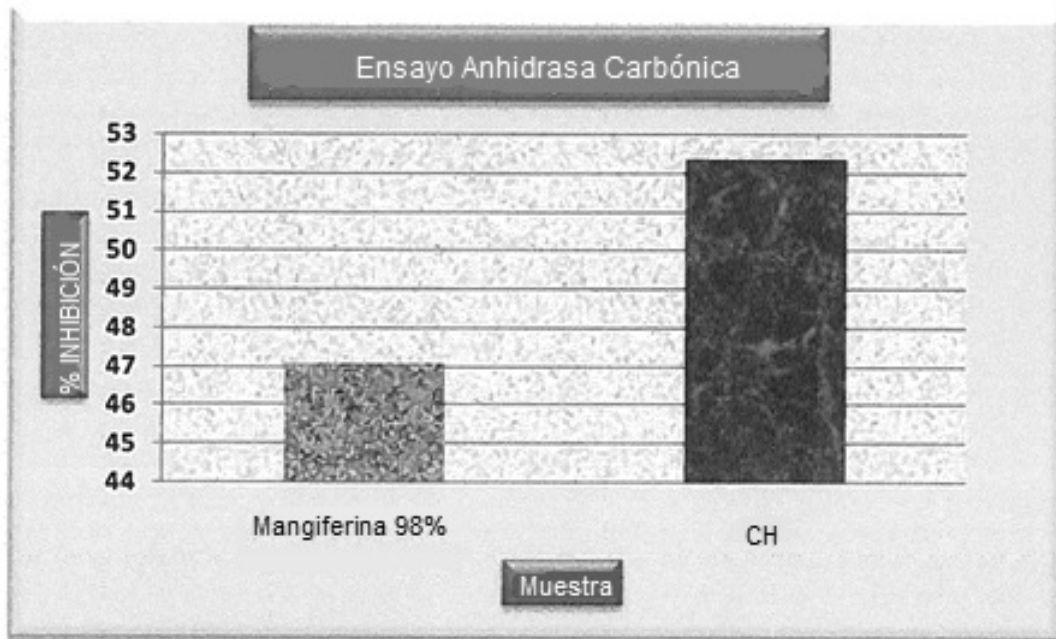


Fig. 3f

