

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 810**

51 Int. Cl.:

A61K 33/00 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61K 35/748 (2015.01)

A23L 17/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2015 PCT/EP2015/070799**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16038175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2015 E 15762983 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3191106**

54 Título: **Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio para una utilización terapéutica**

30 Prioridad:

11.09.2014 FR 1458552

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

03.03.2020

73 Titular/es:

**PHYCO- BIOTECH (33.3%)
188 rue Maurice Bejart
34070 Montpellier, FR;
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%) y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BACCOU, JEAN-CLAUDE;
CRISTOL, JEAN-PAUL;
GAILLET, SYLVIE;
GAY, GILBERT;
JOUY, NICOLAS;
RICHARD, SYLVAIN;
ROUANET, JEAN-MAX;
VIDE, JORIS y
VIRSOLVY, ANNE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 745 810 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

Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio para una utilización terapéutica

La presente invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico. La invención tiene igualmente por objeto la utilización de dicha composición para la prevención o el tratamiento de una patología elegida entre la diabetes, la obesidad, las dislipidemias, las patologías cardiovasculares, la aterosclerosis y la inflamación.

Actualmente, se admite que el aumento de la frecuencia de la sobrecarga ponderal y de la obesidad, de la diabetes de tipo 2 y/o de las enfermedades cardiovasculares en numerosas personas en los países desarrollados se debe a un aporte excesivo de calorías y de materia grasa. Estas patologías están ligadas a una deficiencia metabólica, o síndrome metabólico, que afecta a cerca de 50 millones de americanos (casi un americano adulto de 4) y aproximadamente a 30 millones de europeos. Aproximadamente, el 7% de los adultos entre 20 y 30 años y el 40% de los adultos de más de 40 años presentan los criterios de este síndrome metabólico. El hecho de presentar uno o varios factores ligados al síndrome metabólico- aumento de la tensión arterial, tasa elevada de insulina, exceso de grasa alrededor de la cintura o tasa anormal de colesterol - favorece el riesgo de patologías graves, principalmente la aterosclerosis.

Las composiciones conocidas actualmente utilizadas para tratar o prevenir estas patologías y/o para limitar uno o varios factores de riesgo son principalmente insuficientemente eficaces y muy costosas. Por otra parte, los regímenes hipocalóricos pueden tener un éxito limitado para mejorar la sobrecarga ponderal y la obesidad, y principalmente un efecto limitado en el tiempo.

Existe, por lo tanto, una necesidad de nuevas composiciones para el tratamiento o la prevención de patologías ligadas al síndrome metabólico.

De manera sorprendente, los inventores han puesto de manifiesto que la administración a sujetos de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua conlleva la reducción, o el retorno a un nivel estándar, de determinados parámetros modificados en el caso de la absorción de un régimen rico en lípidos. habiéndose obtenido estos resultados en un modelo animal reconocido de aterosclerosis y de dislipidemias (Vinson *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). En efecto, varios parámetros que caracterizan a los lípidos sanguíneos, el estrés oxidativo y la inflamación, medidos en un animal sometido a un régimen hipercalórico y que recibe una composición según la invención, tienen un nivel similar al de un animal testigo sometido a un régimen alimentario estándar y que no recibe una composición según la invención.

Las ventajas de una composición según la invención son:

- La facilidad, el bajo coste y la reproducibilidad de la producción,
- La estabilidad en el tiempo,
- La calidad del nivel de calidad alimentaria,
- Un fuerte efecto biológico,
- La posibilidad de una administración por vía oral.

Se conoce la importancia del papel del silicio en la formación de los huesos, mejorando la absorción del calcio, la formación del colágeno, componente esencial de la arquitectura de la piel y de los tejidos conjuntivos principalmente de la pared de las arterias y de los cartílagos y el buen estado de las uñas. El silicio se sitúa principalmente en el tejido conjuntivo, en las macromoléculas como los glicosaminoglicanos, el colágeno y la elastina (Seaborne C.D. *et al.*, 1993). Las tasas elevadas de silicio depositadas están presentes en la pared arterial, en particular, en la íntima. En los osteoblastos en cultivo *in-vitro*, el ácido ortosilícico estimula la síntesis de colágeno de tipo 1 y la diferenciación de los osteoblastos (Reffitt *et al.*, 2003).

La presencia de silicio en el tejido aórtico reduce la presión arterial en la rata espontáneamente hipertensa y suprime la expresión de los genes de la angiogénesis en la pared aórtica y de los factores de crecimiento ligados al remodelado vascular (Maehira *et al.*, 2011). Se ha mostrado un efecto antiateromatoso del silicio administrado por vía intravenosa o *per os* en el conejo (Loeper *et al.*, 1979). En esta publicación, los autores utilizan silicato de sodio, silicato de lisina y monometiltrisilanol administrados diariamente durante el estudio bien por vía intravenosa bien *per os*. Estas formas de silicio no se corresponden con las presentes en la composición que comprende una microalga enriquecida con silicio. Además, no es concebible administrar estas formas de silicio por vía intravenosa en el ser humano. No obstante, es en esta forma de administración con la que se han observado resultados positivos en el número de placas de aterosclerosis presentes en las aortas de los conejos tratados. Sin embargo, incluso en estos conejos que reciben estas formas de silicio por vía intravenosa, los autores observan una variación no significativa de los lípidos plasmáticos de los animales que han recibido silicio. No se ha descrito la utilización de una composición que comprende una microalga

enriquecida con silicio para mejorar las características de los lípidos sanguíneos, el estrés oxidativo y/o la inflamación creadas por la absorción de un régimen hipercalórico.

La invención se describirá ahora de manera detallada y con la ayuda de ejemplos, destinados a ilustrar la invención sin limitar de ninguna manera su alcance.

- 5 La presente invención tiene por primer objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según la reivindicación 1.

El término «microalga» designa un alga microscópica fotosintética, pudiendo ser dicha microalga una microalga eucariota o procariota.

- 10 El término «microalga enriquecida con silicio» designa una microalga asociada a silicio presente en cantidad superior respecto a la cantidad de silicio medida habitualmente en asociación con dicha microalga cuando se cultiva en las condiciones estándar o cuando se aísla de su medio natural.

- 15 Una composición según la invención comprende una microalga enriquecida con silicio en la que el silicio puede detectarse en el compartimento intracelular y/o asociado a las membranas y/o asociado a la superficie de dicha microalga. El silicio puede detectarse por cualquier medio conocido por el experto en la técnica, principalmente por la observación microscópica, y preferentemente por microscopía electrónica acoplada con una microsonda de rayos X. Durante la observación por microscopía electrónica acoplada con una microsonda de rayos X, pueden observarse los granos de silicio particularmente densos.

- 20 El término «silicio en una forma soluble en agua», o eventualmente «silicio soluble en agua», designa el silicio presente y detectable en un extracto acuoso de una composición según la invención. Según un aspecto particular de la invención, dicho silicio en una forma soluble en agua está presente en un extracto acuoso de una composición según la invención que comprende una microalga enriquecida con silicio. La detección de la presencia de silicio asociado a una microalga en una composición según la invención puede realizarse igualmente por cualquier medio químico o bioquímico conocido por el experto en la técnica.

- 25 El término «silicio en una forma soluble en agua» o «silicio en una forma soluble» o «silicio solubilizable» designa el silicio disponible en una forma reducida y que puede asimilarse por el organismo, contrariamente al silicio mineral, que está en una forma oxidada, tal como la sílice, que puede precipitar y no es asimilable por el organismo. En una composición según la invención, el silicio presente en una forma soluble en agua puede presentarse en una forma simple o en una forma en complejo con una molécula orgánica.

- 30 El término «patología ligada al síndrome metabólico» designa una de las patologías que pueden observarse y participar en el síndrome metabólico. El síndrome metabólico representa un conjunto de factores que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares, de ataques cerebrales y de diabetes de tipo 2. El término «síndrome metabólico» también puede designar el síndrome cardiometabólico o la prediabetes. La prevención de una patología ligada al síndrome metabólico designa igualmente la mejora del bienestar de un consumidor cuya alimentación es rica en calorías y/o en materia grasa, y que, de este modo, presenta un riesgo de estrés oxidante y/o de enfermedad cardiovascular.

- 35 En una publicación de 2004 titulada «*Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*», La Organización Mundial de la Salud (OMS), evaluó el impacto de 24 factores de riesgo sobre la mortalidad a escala mundial, compilando datos científicos y sanitarios que provenían de todos los países, industrializados o no. Entre los factores de riesgo principales, la OMS indica que los factores «hipertensión», «una tasa de glicemia elevada», «inactividad física», «sobrepeso y obesidad» y una tasa elevada de colesterol» computan un 33,4% de las muertes a nivel planetario, todos los países combinados. No obstante, estos factores de riesgo corresponden al síndrome metabólico.

- 45 Según un aspecto particular, una composición según la invención comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, eligiéndose dicha microalga entre las microalgas eucariotas. Según un aspecto más particular de la invención, dicha microalga eucariota se elige en el grupo constituido por: las Chlorophyceae (y, preferentemente, *Dunaliella*, *Chlorella* o *Parietochloris incisa*), las Chrysophyceae, las Coccolithophyceae, las Diatomeas, las Euglenophyceae, las Rhodophyceae y las Trebouxiophyceae.

- 50 Según otro aspecto particular, una composición según la invención comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, eligiéndose dicha microalga entre las microalgas procariotas, también designadas por el término «cianobacterias» o «algas azules». Según un aspecto más particular de la invención, dicha microalga procariota se elige del grupo constituido por las cianofíceas, entre las cuales se prefiere particularmente la espirulina.

- 55 Según un aspecto particular, la invención tiene, por lo tanto, por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, siendo dicha microalga la espirulina, estando destinada dicha composición a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, tal como se ha definido anteriormente.

El término «espirulina» designa un alga filamentosa azul - verde que pertenece al filo Cyanophyta, de la clase de las Cyanophyceae, del orden Nostocales, familia Oscillatoriaceae, y del género Spirulina o Arthrospira, y preferentemente *Arthrospira platensis* o *Arthrospira maxima*.

5 Las espirulinas son microalgas muy ricas en proteínas, del orden del 70% de proteínas respecto a la materia seca, que son un complemento nutricional reconocido por su eficacia y están autorizadas en la alimentación humana. Las espirulinas se cultivan frecuentemente en estanques, o eventualmente en reactores tubulares, y esto permite controlar las condiciones de cultivo para obtener resultados reproducibles en cuanto a la composición de la materia vegetal obtenida, por comparación con los cultivos de vegetales realizados en campo abierto o incluso e invernadero.

10 Según un aspecto más particular, la presente invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, eligiéndose dicha microalga entre *Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima*.

Según un aspecto particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse como medicamento.

15 Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse como composición farmacéutica, como nutracéutico o como complemento alimentario, para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, tal como se ha definido anteriormente.

20 Una composición según la invención puede comprender una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, y opcionalmente cualquier vehículo o excipiente apropiado, aceptable desde el punto de vista farmacéutico, cosmético, alimentario o nutracéutico, así como aditivos convencionales, conocidos por el experto en la técnica.

25 Según un aspecto particular, una composición según la invención se formula para ser administrada por vía oral. Según otro aspecto particular, una composición según la invención se presenta en la forma de cápsula dura, cápsula, comprimido, gránulo, tableta, polvo o disolución bebible. Una composición según la invención formulada para ser administrada por vía oral como complemento alimentario puede presentarse en la forma de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, según la invención, o bien en la forma de cápsulas duras o de cápsulas blandas de gelatina o vegetales. Dicho complemento alimentario puede contener del 10 al 100% en peso de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua.

30 Los modos de administración, las posologías y las formas galénicas óptimas de los compuestos y composiciones según la invención pueden determinarse según los criterios tenidos generalmente en cuenta en el establecimiento de un tratamiento farmacéutico, en particular, dermatológico, cosmético o veterinario adaptado a un paciente o a un animal como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente o del animal, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento, los efectos secundarios constatados, el tipo de piel. En función del tipo de administración deseado, la composición y/o los compuestos activos según la invención pueden comprender además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, o un excipiente cosméticamente aceptable.

35 La composición según la presente invención puede comprender además al menos un adyuvante farmacéutico o cosmético conocido por el experto en la técnica, elegido entre los espesantes, los conservantes, los perfumes, los colorantes, los filtros químicos o minerales, los agentes hidratantes, las aguas termales, etc.

La invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse como medicamento para su utilización para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, eligiéndose dicha patología entre:

- La diabetes de tipo 2,
- 45 - La obesidad nutricional,
- Las dislipidemias,
- Las patologías cardiovasculares,
- La aterosclerosis, y
- La inflamación.

50 La diabetes de tipo 2 se caracteriza por una hiperglicemia crónica. Según un aspecto particular, una composición según la invención se utiliza como medicamento para prevenir o tratar una desregulación de la secreción de la insulina y/o para la prevención o el tratamiento de la resistencia a la insulina.

La obesidad se corresponde con un exceso de masa grasa.

El término «dislipidemia» designa una tasa anormal de lípidos en la sangre. Este término incluye principalmente las hiperlipidemias, es decir, una elevación de la tasa de lípidos sanguíneos observada con una alimentación rica en grasas. Entre las hiperlipidemias, se pueden citar:

- 5 - Una elevación de la tasa de lipoproteínas elegidas entre los quilomicrones, las IDL (lipoproteína de densidad intermedia), las HDL (lipoproteínas de densidad alta), las LDL (lipoproteínas de densidad baja).
- Una elevación de la tasa de colesterol total,
- Una elevación de la tasa de triglicéridos y
- Una combinación de dos o más de estos parámetros.

- 10 Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse como medicamento para la prevención o el tratamiento de una patología cardiovascular. El término «patología cardiovascular» designa una patología que afecta al sistema el corazón y la circulación sanguínea de un sujeto, y principalmente las enfermedades coronarias, las enfermedades del músculo cardiaco, de las válvulas cardiacas o del pericardio, las enfermedades del ritmo o de la
- 15 conducción cardiaca, las enfermedades de los vasos, las patologías arteriales (hipertensión e hipotensión arterial), los trastornos de la función contráctil arterial, el ateroma y la aterosclerosis. En efecto, los inventores han mostrado que la administración a un sujeto de una composición según la invención permite observar un efecto vasculoprotector.

- Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una
- 20 inflamación, y/o de una inflamación de bajo nivel.

Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o la disminución de la sobrecarga ponderal, para la prevención o la disminución de la adipogénesis o como agente antioxidante.

- Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse como medicamento para la prevención o el tratamiento de una patología asociada a, o resultado de, un estrés oxidante. El «estrés oxidante» se caracteriza principalmente por un estado que comprende la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno, por ejemplo, los aniones superóxido.
- 25

- Según otro aspecto, una composición según la invención comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, en la que la proporción de silicio total en dicha composición, respecto a la masa seca de microalga presente en dicha composición, está comprendida entre el 0,05% y el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10%, y preferentemente entre el 0,1 % y el 5%, preferentemente entre el 0,5% y el 5%, preferentemente entre el 0,9% y el 4%, entre el 0,9% y el 3%, entre el 0,9% y el 2% y más preferentemente entre el 0,9% y el 1,5%.
- 30

- El término «silicio total» designa la cantidad total de silicio detectada en una composición según la invención. Según un aspecto particular de la invención, el término «silicio total» designa la cantidad total de silicio detectada en la masa seca de microalga comprendida en una composición destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, según la invención. La cantidad total de silicio puede determinarse por cualquier método conocido por el experto en la técnica después de la mineralización total de la muestra de la composición según la invención, principalmente por dosificación gravimétrica, por ICP-OES (Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente) o por ICP-MS (Espectro de Masa de Plasma Acoplado Inductivamente).
- 35
- 40

- El término «masa seca de microalga» designa la masa de microalga presente en la composición, determinada después de la deshidratación de la microalga, pudiendo realizarse la deshidratación o el secado de dicha microalga por cualquier protocolo elegido entre los protocolos conocidos por el experto en la técnica. El término de «masa seca de microalga» puede considerarse como equivalente al término biomasa.
- 45

- Según un aspecto particular, una composición según la invención comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, en la que la proporción de silicio en una forma soluble en agua en dicha composición, respecto a la cantidad de silicio total presente en la composición, está comprendida entre el 5% y el 90%, preferentemente entre el 10% y el 80%, preferentemente entre el 15% y el 75%, preferentemente entre el 20% y el 70%, preferentemente entre el 25% y el 65%, preferentemente entre el 30% y el 60%, preferentemente entre el 35% y el 65%, preferentemente entre el 40% y el 60% del silicio total presente en dicha composición.
- 50

En dicha composición según la invención, la proporción de silicio en una forma soluble en agua puede determinarse por cualquier medio conocido por el experto en la técnica, y principalmente por la extracción de dicha composición según la invención con una disolución acuosa. Preferentemente, la proporción de silicio en una forma soluble en agua en una composición según la invención puede determinarse por extracción secuencial de la composición con disoluciones acuosas de agentes activos de una composición según la invención. Si el silicio está presente en una forma soluble en agua, se solubilizará parcialmente o totalmente a lo largo de las extracciones sucesivas. Si el silicio está presente en una forma polimerizada, permanecerá en una forma insoluble a pesar de las extracciones sucesivas. La extracción puede realizarse principalmente con: agua, una disolución enzimática capaz de degradar las paredes celulares vegetales, una disolución de detergente capaz de solubilizar las fracciones lipófilas, o una disolución enzimática capaz de digerir las proteínas. La cantidad de silicio presente en un extracto acuoso, o en cualquier extracto de una composición destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, según la invención, puede determinarse por cualquier método conocido por el experto en la técnica, principalmente por dosificación gravimétrica, por ICP-OES (Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente) o por ICP-MS (Espectro de Masa de Plasma Acoplado Inductivamente).

Según otro aspecto, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, tal como se ha definido anteriormente, obteniéndose dicha composición por la aplicación de un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

a) la puesta en cultivo de dicha microalga en las condiciones y un medio de cultivo adaptados, hasta la obtención de un cultivo de microalga caracterizado por una biomasa seca comprendida entre 0,1 y 2 g/litro de cultivo,

b) la preparación de una disolución acuosa de silicio, mediante la adición de silicio en la forma de una disolución o de un polvo, seguido de la agitación de la disolución acuosa hasta la disolución completa del silicio,

c) la adición de la disolución preparada en b) al cultivo de microalga obtenido en a),

d) la puesta en cultivo de dicha microalga con agitación durante una duración de al menos 12 horas,

e) la cosecha de al menos una parte del cultivo de microalga.

Según un aspecto más particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, tal como se ha definido anteriormente, obteniéndose dicha composición por la aplicación de un procedimiento que comprende la puesta en cultivo de dicha microalga en las condiciones y un medio de cultivo adaptados, hasta la obtención de un cultivo de microalga caracterizado por una biomasa seca comprendida entre 0,1 y 2 g/litro de cultivo, seguido de la preparación de una disolución acuosa de silicio y de polifenoles, por la adición de polifenoles a una disolución acuosa de silicio o por la adición de silicio a una disolución acuosa de polifenoles, seguido de un mezclado por agitación.

En un procedimiento de preparación de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, según la invención, el cultivo de microalgas se realiza en las condiciones adaptadas al cultivo de las microalgas y conocidas por el experto en la técnica. El cultivo de las microalgas se realiza en las condiciones que permitan evitar las contaminaciones atmosféricas, principalmente en invernadero y en un estanque que permita una penetración óptima de la luz, y, por lo tanto, la actividad fotosintética, por ejemplo, en estanques de 25 M³ y de poca profundidad, entre 15 y 25 cm, y preferentemente 20 +/- 3 cm. En efecto, el riesgo de cosechar la espirulina que crece naturalmente en los lagos es el ver proliferar determinadas cianobacterias tóxicas en estas condiciones no controladas.

El modo de cultivo más común y menos costoso para la espirulina es el estanque de tipo «raceway» en donde la agitación se asegura por una rueda de paletas y con un tabique central que permite hacer circular el cultivo en un circuito cerrado. Este modo de producción permite aislar el cultivo en los estanques de poca profundidad donde los aportes minerales del medio de cultivo artificial están controlados.

El cultivo es posible en tanque de 1 M³ con el mismo medio de cultivo y agitación por burbujeo de aire comprimido o por bomba. Otro modo de cultivo es posible en un fotorreactor tubular, esencialmente utilizado para el cultivo de microalgas unicelulares como la clorela.

El cultivo de microalgas se realiza generalmente a un pH comprendido entre pH6 y pH12, preferentemente a pH alcalino, más preferentemente a un pH comprendido entre pH9 y pH11, y más preferentemente a pH10. El cultivo puede realizarse en invernadero, con iluminación natural y/o artificial, lo que permite realizar la fotosíntesis, en condiciones controladas de temperatura, de pH y de alimentación de dióxido de carbono. La agitación se realiza por una o dos bombas, una rueda de paletas o un burbujeo de aire comprimido para asegurar la circulación del cultivo y un mezclado en profundidad. La temperatura del cultivo está comprendida entre 15 y 40 °C con un óptimo a 33 °C.

La duración de la etapa de cultivo de la microalga, en las condiciones y un medio de cultivo adaptado, hasta la obtención de un cultivo caracterizado por una biomasa seca comprendida preferentemente entre 0,4 y 0,6 g/litro,

depende de la concentración de la siembra inicial y de las condiciones de luz y de temperatura aplicadas al cultivo, y está comprendida típicamente entre 3 y 21 días.

5 En la etapa de preparación de una disolución acuosa de silicio, la disolución de silicio se realiza en una disolución acuosa o en agua, y preferentemente en agua desionizada o purificada, es decir, que no contiene nada o muy poco de minerales, y en un volumen restringido respecto al volumen final del cultivo de microalga, el volumen de agua en el que se disuelve el silicio está comprendido típicamente entre 1/20 y 1/30 del volumen final de cultivo. El agua puede filtrarse y esterilizarse por irradiación UV antes de utilizarse para la preparación de la disolución y verterse en el estanque.

10 El silicio en forma soluble se encuentra esencialmente en forma de ácido ortosilícico Si(OH)_4 en las aguas de superficie. A una concentración superior a 2mM y a pH neutro, el ácido ortosilícico polimeriza en diferentes formas de sílice, de coloidal a sólida, poco o nada soluble. Por lo tanto, es esencial mantenerlo en disolución con el fin de que permanezca absorbible por la microalga, aunque el pH preferentemente alcalino del medio de cultivo de una microalga sea favorable a la solubilización del ácido ortosilícico.

15 El silicio puede añadirse a la disolución acuosa en la forma de una disolución o de un polvo, con agitación hasta la disolución completa del silicio.

El silicio también puede añadirse en una forma combinada, por ejemplo, en la forma de silicato. En particular, el silicio puede añadirse en la forma de una composición elegida entre:

- metasilicato de sodio o metasilicato de potasio, que se disuelve totalmente en agua y libera ácido ortosilícico en disolución. El metasilicato de sodio o potasio se presenta en forma de polvo o de disolución acuosa concentrada.
- 20 - un abono o cualquier composición que contiene silicio donde todo o parte está en forma soluble de ácido ortosilícico.
- una enmienda silícica utilizada en agricultura.

25 En el caso de una composición en forma de polvo, esta se añadirá en la forma de un polvo cuyo tamaño de partículas es inferior a 30 micrómetros, preferentemente inferior a 20 micrómetros y más preferentemente inferior a 10 micrómetros. Esto permite, durante la cosecha de las espirulinas por tamizado en una tela filtrante de malla de 30 μm , que las partículas sean eliminadas durante el tamizado, limitando así la presencia de silicio en forma mineral en la composición que comprende las espirulinas. El silicio puede añadirse en la forma de un abono de tipo Agrosil triturado, caracterizado por partículas con un tamaño inferior a 10 micrómetros.

30 Una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, según la invención, puede obtenerse por la aplicación de un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- a) la puesta en cultivo de microalgas en las condiciones y un medio de cultivo adaptados, hasta la obtención de un cultivo caracterizado por una biomasa seca comprendida entre 0,1 y 2 g/litro, preferentemente entre 0,2 y 1 g/litro, preferentemente entre 0,3 y 0,8 g/litro, y preferentemente entre 0,4 y 0,6 g/litro de cultivo,
- 35 b) la preparación de una disolución acuosa de silicio y de polifenoles, añadiéndose el silicio en la forma de una disolución, o de un polvo, y añadiéndose los polifenoles en la forma de una disolución, seguido de un mezclado por agitación de la disolución así obtenida hasta la disolución completa del silicio y de los polifenoles,
- c) la adición de la disolución preparada en b) al cultivo de microalgas obtenido en a),
- d) la puesta en cultivo de las microalgas con agitación durante una duración de al menos 12 horas,
- e) la cosecha de al menos una parte del cultivo de microalgas.

40 La preparación de una disolución acuosa de silicio y de polifenoles, en la etapa b), puede realizarse por la adición de silicio a la disolución acuosa, seguido de la adición de polifenoles, o bien por la adición de polifenoles a la disolución acuosa, seguido de la adición de silicio.

45 El término «polifenoles» designa un compuesto que comprende uno o varios ciclos bencénicos a los que están unidos uno o varios grupos hidroxilo, pudiendo estar los grupos hidroxilo libres o unidos en otra función, este término designa, por lo tanto, un gran número de compuestos posibles, que agrupa a las moléculas simples tales como los ácidos fenólicos hasta los compuestos altamente polimerizados como los taninos, y se caracterizan por un poder antioxidante elevado.

50 Los polifenoles pueden elegirse principalmente entre: los fenoles simples tales como la hidroquinona, los ácidos hidroxibenzoicos, los ácidos hidroxicinámicos, las cumarinas, las naftoquinonas, los estilbenoides, los flavonoides, los isoflavonoides, los antocianos, los lignanos, las ligninas, los taninos condensados.

Los polifenoles están presentes en diversas sustancias naturales. Este es el caso principalmente de la antocianina en los frutos rojos, de las proantocianidinas en el chocolate y el vino, de los ácidos cafeoilquínico y feruloilquínico en el café, de los flavonoides en los cítricos, de las catequinas en el té verde y de la quercetina en las manzanas.

5 Los compuestos fenólicos tienen la propiedad de formar complejos parcialmente con las funciones hidroxilos ionizadas del ácido ortosilícico en disolución y así ralentizar la polimerización del ácido ortosilícico.

La adición de la disolución de silicio y de polifenoles al cultivo de microalgas da lugar a un cultivo de microalgas en el que la concentración de silicio está comprendida entre 0,1 y 20 g/litro de cultivo, entre 0,5 y 4 g/litro de cultivo, entre 1 y 3 g/litro de cultivo y preferentemente 2 g/litro de cultivo, y la concentración de polifenoles está comprendida entre 1 y 300 mg/litro de cultivo, preferentemente entre 5 y 60 mg/litro de cultivo.

10 La disolución de polifenoles añadida puede ser un extracto de polifenoles naturales. En particular, dicho extracto de polifenoles naturales puede elegirse entre los extractos vegetales, y principalmente elegirse entre:

- un extracto de polifenoles de aceitunas, principalmente un extracto de efluentes de la almazara de aceitunas,

- un extracto de polifenoles de hojas de té,

15 - un extracto de polifenol de uvas, principalmente un extracto de orujo y/o de pepitas de uva, pudiendo ser la uva blanca o roja,

- un extracto de polifenol de jengibre o de romero, y

- una mezcla de estos extractos.

20 Estos productos se presentan en forma de polvo de solubilidad variable en agua o en forma acuosa concentrada. Los polifenoles de aceituna o de uva presentan la ventaja de ser productos localmente en grandes cantidades y que constituyen subproductos poco costosos de los sectores vitícolas y oleicos.

25 Según otro aspecto particular de un procedimiento de preparación de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, según la invención, la disolución de polifenoles comprende al menos un polifenol de origen sintético. Una preparación de ácido ortosilícico estabilizada por colina se ha autorizado como complemento alimentario por la EFSA (The EFSA Journal, 2009, 948, 1-23). La colina podría utilizarse, por lo tanto, como compuesto que permite mantener al ácido ortosilícico en disolución. Sin embargo, la colina es un producto bastante costoso y deberían utilizarse cantidades importantes por estanque de 25M³ en sustitución de los polifenoles de uva, de aceituna, de té o de otras plantas.

30 Según un aspecto particular de un procedimiento de preparación de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua según la invención, las microalgas se cosechan por tamizado, centrifugación o floculación, y preferentemente por tamizado. Según un aspecto preferido, la microalga se cosecha por tamizado en una tela filtrante de malla comprendida entre 20 y 40 micrómetros, y preferentemente de 30 micrómetros.

35 En un procedimiento de preparación de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua según la invención, la cosecha de una fracción del cultivo de microalga comienza después de un tiempo de incubación de la microalga con el silicio, y eventualmente los polifenoles comprendido entre 12H y 3 días; durante este periodo, la biomasa de espirulina aumenta al menos un 20%. Según un aspecto particular de un procedimiento según la invención, la cosecha de fracciones sucesivas del cultivo de microalga se realiza todos los días, según el estado del cultivo y esto durante una duración de 2 a 8 semanas, preferentemente aproximadamente 3 semanas. Según otro aspecto particular de un procedimiento según la invención, se añade una nueva disolución acuosa de silicio, que comprende preferentemente polifenoles, aproximadamente 3 semanas después de la cosecha, en el estanque de cultivo, para un nuevo ciclo de enriquecimiento.

45 La cantidad de microalga cosechada cada día se determina sin poner en peligro todo el cultivo. Esta cantidad varía del 5% al 15% de la cantidad total de microalga en el cultivo. Después de cada cosecha parcial, se añade una cantidad calculada de elementos minerales del medio de Zarouk, o de cualquier otro medio de cultivo utilizable para este procedimiento, en el estanque con el fin de compensar los elementos minerales consumidos por las microalgas cosechadas. También es posible cosechar la totalidad de las microalgas del estanque al cabo de 8 días de cultivo.

50 Según un aspecto particular de un procedimiento de preparación de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, según la invención, la microalga cosechada se filtra y se seca para obtener una composición de microalga deshidratada o parcialmente deshidratada. Preferentemente, el secado se efectúa a una temperatura inferior a 60 °C, para evitar desnaturalizar los principios activos contenidos en las composiciones de microalga. Según un aspecto aún más particular de un procedimiento según la invención, el polvo secado de microalga se tritura.

Según un aspecto particular de un procedimiento de preparación de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua según la invención, después de la adición de la disolución acuosa

de silicio, la concentración de silicio en el medio de cultivo durante la etapa c) está comprendida entre 0,1 y 20 g/litro de cultivo, entre 0,5 y 4 g/litro, entre 1 y 3 g/litro, y preferentemente 2 g/litro. El aporte de 2g/litro de silicio puede realizarse en una sola vez o de forma secuencial, por ejemplo, en 2 días consecutivos, aportando 1g/litro de silicio el primer día y 1g/litro de silicio el segundo día.

- 5 La concentración de polifenoles en el cultivo está comprendida entre 5 y 60 mg/litro, preferentemente entre 10 y 20 mg/litro y más preferentemente 12 mg/litro de cultivo.

El aporte de 2g/litro de silicio y de polifenoles puede realizarse en una sola vez o de forma secuencial, por ejemplo, en 2 días consecutivos, aportando 1g/litro de silicio y de polifenoles el primer día y 1g/litro de silicio y de polifenoles el segundo día.

- 10 Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico tal como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la dosis de silicio administrada a un sujeto está comprendida entre 0,3 y 1 mg/kg de peso corporal/día, preferentemente entre 0,4 y 0,8 mg/kg de peso corporal/día, y más preferentemente entre 0,5 y 0,7 mg/kg de peso corporal/día. La dosis de silicio, o cantidad de silicio, administrada es la cantidad de silicio total, calculada por gravimetría.
- 15

Otro objeto de la invención consiste en la utilización de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua para la prevención o el tratamiento de una patología elegida entre: la diabetes de tipo 2, la obesidad nutricional, las dislipidemias, las patologías vasculares y la inflamación.

- 20 Más particularmente, la invención tiene por objeto la utilización de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua para la prevención o el tratamiento de una patología elegida entre: la diabetes de tipo 2, la obesidad nutricional, las dislipidemias, las patologías vasculares y la inflamación, en la que el paciente tratado presenta un síndrome metabólico o una diabetes de tipo 2.

- 25 Otro objeto de la invención consiste en la utilización de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua para la prevención o el tratamiento de la sobrecarga ponderal, para la prevención o la disminución de la adipogénesis o como agente antioxidante, para la regulación de la secreción de un agente elegido entre: TNF- α , IL-6, NF κ B, MCP-1 plasmático, para la prevención o el tratamiento de la inflamación de bajo nivel, o para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al estrés oxidativo.

- 30 Finalmente, según un aspecto aún más particular, la invención tiene por objeto la utilización de una composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, en la que dicha microalga es la espirulina.

La presente invención se describirá ahora en los ejemplos, destinados a ilustrar la invención sin disminuir su alcance.

Leyendas de las figuras

- 35 Figura 1: Histograma que representa el nivel de MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1, en pg/mL) en el plasma de hámsteres alimentados con un régimen alimentario estándar (STD), un régimen enriquecido con grasas (HF por High-Fat), un régimen HF al que se añadió espirulina enriquecida con silicio (HF-SES por Silicon Enriched Spirulina) o un régimen HF al que se añadió espirulina no enriquecida con silicio (HF-Sp por Spirulina), durante 12 semanas. Los valores indican la media \pm SEM (n=6). Para cada uno de los regímenes dietéticos, las barras con diferentes letras en índice son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

- 40 Figuras 2A y 2B: Nivel de NADPH oxidasa hepática (Figura 2A) o cardiaca (Figura 2B) en el plasma de hámsteres que han recibido un régimen alimentario estándar STD, HF, HF-SES o HF-Sp durante 12 semanas. Los valores indican la media \pm SEM (n=6). Para cada uno de los regímenes dietéticos, las barras con diferentes letras en índice son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

- 45 Figuras 3A y 3B: Nivel de superóxido dismutasa (Figura 3A) o glutatión peroxidasa (Figura 3B) en el plasma de hámsteres que han recibido un régimen alimentario STD, HF, HF-SES o HF-Sp durante 12 semanas. Los valores indican la media \pm SEM (n=6). Para cada uno de los regímenes dietéticos, las barras con diferentes letras en índice son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

- 50 Figuras 4A a 4D: Evaluación histológica de esteatosis hepática de hámsteres alimentados, respectivamente, con un régimen alimentario estándar (STD, Figura 4A), HF (Figura 4B), HF-SES (Figura 4C) o un régimen HF-Sp (Figura 4D) durante 12 semanas. Se muestran las secciones representativas de tejido hepático (aumento x40). S: capilar sinusoidal, H: hepatocito, N: núcleo, MS: esteatosis microvascular, PN: células polinucleares.

Figuras 5A y 5B: Representación del estado inflamatorio indexado sobre la concentración de citoquinas en el hígado, respectivamente el nivel de TNF-alfa (Figura 5A) o de IL-6 (Figura 5B) de hámsteres que han recibido un régimen alimentario STD, HF, HF-SES o HF-Sp durante 12 semanas. Los valores indican la media \pm SEM (n=6). Para cada uno de los regímenes dietéticos, las barras con diferentes letras en índice son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 6: Actividad de NFκB (en ng por g de hígado) en el hígado de hámsteres que han recibido un régimen alimentario STD, HF, HF-SES o HF-Sp durante 12 semanas. Los valores indican la media +/- SEM (n=6). Para cada uno de los regímenes dietéticos, las barras con diferentes letras en índice son significativamente diferentes (p<0,05).

5 Figuras 7A y 7B: Representación de la respuesta contráctil a la fenilefrina. Histograma que representa la contracción (en g) para cada una de las condiciones ensayadas, con de G a D: STD, HF, HF-SES, HF-Sp (Fig. 7A). Representación de la contracción (en g) para cada una de las condiciones ensayadas (STD, HF, HF-SES, HF-Sp) en función de la concentración de fenilefrina (en M) (Fig. 7B).

Figuras 8A a 8D: Representación de la respuesta contráctil de las aortas sometidas a antagonistas de la contracción. Figuras 8A y 8B: relajación en respuesta al SNP. Figura 8A: histograma que representa la relajación (en % de PE de contracción) para cada una de las condiciones ensayadas, con de izquierda a derecha: STD, HF, HF-SES, HF-Sp. Figura 8B: Representación de la relajación (en % de PE máx) para cada una de las condiciones ensayadas (STD (círculos claros), HF (círculos negros), HF-SES (cuadrados claros) en función de la concentración de SNP (en log(SNP), en M). Figuras 8C y 8D: relajación en respuesta a la acetilcolina. Figura 8C: histograma que representa la relajación (en % de PE de contracción) para cada una de las condiciones ensayadas, con de G a D: STD, HF, HF-SES, HF-Sp. Figura 8D: Representación de la relajación (en % de PE máx) para cada una de las condiciones ensayadas (STD (círculos claros), HF (círculos negros), HF-SES (cuadrados claros) en función de la concentración de acetilcolina (en log(acetilcolina), en M).

Ejemplos

Ejemplo 1: Caracterización del estado metabólico, antioxidante y antiinflamatorio en un modelo animal

20 Producción de las microalgas

Las espirulinas se obtienen por la puesta en cultivo de espirulina de la cepa *Arthrospira platensis* en un medio de cultivo específico adaptado a partir del medio Zarouk, caracterizado por un pH comprendido entre 9 y 10,5, que contiene, en g/L: NaHCO₃ 8; K₂SO₄ 1; KNO₃ 2; K₂SO₄ 1; NaCl 5; MgSO₄/7H₂O, 2; NH₄H₂PO₄ 0,2 ; Ferfol (Fer EDTA) 0,02 y en mg/L: MnCl₂/4H₂O 117; CuSO₄/5H₂O 25; ZnSO₄/4H₂O 250. El cultivo se realiza en un estanque de 25 m³ en invernadero. La agitación se asegura por bombas de circulación o ruedas de paletas. El enriquecimiento con silicio se realiza vertiendo en los estanques una disolución concentrada de metasilicato de sodio (Na₂O₃Si) previamente disuelto en presencia de polifenoles en agua desionizada en un volumen de 1 M³, esto con el fin de prevenir la polimerización del metasilicato en sílice insoluble. Para un estanque de 25 M³, se disuelven 50 kg de metasilicato de sodio en un volumen del orden de 1 M³ de agua desionizada. Después de la disolución completa del metasilicato de sodio, se añaden 300 g de polifenoles de té a la disolución y esta se agita durante 30 minutos. Los polifenoles de té se añaden en la forma de un extracto de hojas de té verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), en la forma de un polvo marrón dispersable en agua, que contiene un 98% de polifenoles, 75% de catequinas, 40% de EGCG (Galato de epigalocatequina) y 0,5% de cafeína (Naturex, Francia, Ref. EA140374). El metasilicato va a reaccionar con los polifenoles y se estabiliza. La disolución se vierte suavemente entonces en el estanque de 25 M³ que contiene el cultivo de espirulina ya presente a una concentración en biomasa seca de 0,5g/litro, aproximadamente. La concentración de metasilicato de sodio en la disolución inicial es de 50 g/litro con el fin de obtener una concentración final de metasilicato de sodio de 2g/litro de cultivo en los 25 M³ del estanque. La concentración de polifenoles es de 0,3 g/litro en la disolución inicial, esta alcanza 0,012g/litro en el estanque de cultivo.

Después de cultivar la espirulina en presencia de silicio y de polifenoles durante una duración comprendida entre 12 horas y 3 días, el cultivo se cosecha en parte o totalmente. La cosecha de una parte del cultivo de espirulina se efectúa por filtración a través de una membrana de malla de 40 micrómetros, se prensa, se extruye en filamentos de 1mm de diámetro y se seca a 40 °C.

La cantidad total de silicio de las espirulinas así producidas es del 1 % de la masa seca. Esta proporción de silicio se determina por dosificación gravimétrica. La proporción de silicio presente en una forma soluble en agua se determina por extracción secuencial en presencia de disoluciones acuosas de agentes cada vez más activos. El protocolo se repite para toda la serie de agentes de extracción y el sedimento final residual se recupera para realizar una dosificación del silicio residual insoluble. Si el silicio está presente en forma metabolizada disponible, se solubilizará totalmente o parcialmente durante las extracciones sucesivas. La proporción de silicio soluble en agua está comprendida entre el 30 y el 60% del silicio total.

50 Experimentación animal

Veinticuatro hámsteres sirios dorados machos (Janvier-Labs, Le Genest, Saint-Isle, Francia) que pesaban 90 g de media se repartieron al azar en cuatro grupos de seis animales. Se pusieron a 23 ± 1 °C, se sometieron a un fotoperiodo de 12L/12D y se trataron según las reglas de la Unión Europea y según las líneas directrices del NIH (National Research Council, 1985) así como del Comité de protección de los animales de la Universidad de Montpellier (Francia). Un grupo recibió un régimen estándar (STD), los otros tres grupos recibieron durante 12 semanas un régimen hiperlipídico (HF), que contenía 200 g/kg de caseína, 3 g/kg de L-metionina, 393 g/kg de almidón de maíz, 154 g/kg de sacarosa, 50 g/kg de celulosa, 100 g/kg de aceite de coco hidrogenado, 2 g/kg de colesterol, 35 g/kg de mezcla mineral y 10 mg/kg de mezcla vitamínica. Los hámsteres de cada grupo recibieron por sonda bien agua (régimen STD,

y régimen HF), bien la espirulina nativa no enriquecida (régimen HF, grupo HF -SP), bien la espirulina enriquecida con silicio (régimen HF, grupo HF-SES). En todos los casos, la alimentación por sonda intragástrica (1 ml/día/hámster) se realizó a partir de espirulina (SP o SES) en suspensión en agua y correspondió a una dosis de espirulina de 57 mg/kg de peso corporal.

5 Procedimientos analíticos

Al final del periodo experimental (12 semanas), los hámsteres permanecen en ayuno durante una noche. Se toman muestras de sangre por punción cardiaca y se prepara el plasma por centrifugación a 2.000 g durante 10 min. Se determinaron el colesterol total (CT) y el colesterol HDL (HDL-C) utilizando kits enzimáticos (CH 200 y CH 203 respectivamente, Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Reino Unido). El colesterol de las VLDL y LDL se precipitó utilizando el reactivo de fosfatungstato (Weingand y Daggy, 1990), y el colesterol-HDL se midió en el sobrenadante. Los triglicéridos plasmáticos (TG) se midieron utilizando un kit Randox (TR 1697) y la glicemia mediante una técnica enzimática (KonePro, Konelab, Evry -Les- Lys, Francia) utilizando los reactivos suministrados por Thermo Electron Corporation (Cergy Pontoise, Francia). La actividad de la paraoxonasa (PON) se determinó con el paraoxón como sustrato y se midió por el aumento de la absorbancia a 412 nm debido a la formación de 4-nitrofenol, según la técnica de Jaouad et al. (2006). La insulinemia se determinó mediante un kit ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Suecia). La concentración de «proteína quimioatrayente de monocitos-1» (MCP-1) plasmática se midió utilizando un kit Elisa específico según las instrucciones del fabricante (R & D Systems Europe, Lille, Francia). La evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) se determinó a partir de los valores de la insulinemia y de la glicemia en ayunas según Matthews et al. (1985): $HOMA-IR = ((\text{glicemia en ayunas (mmoles/L)} \times \text{insulinemia en ayunas (mU/L)}) / 22,5$.

El hígado se escindió, se pesó y se seccionó. Se utilizaron determinadas muestras para la histología, mientras que otras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización posterior. Para el análisis anatomopatológico, las muestras de hígado se fijaron en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina. Se prepararon cortes de 3 micrómetros de espesor, se desparafinaron y se colorearon con hematoxilina y eosina. Las muestras de hígado no fijadas se homogeneizaron en tampón fosfato de potasio 0,1 M enfriado en hielo (pH 7,4) y el homogenado se centrifugó a 13.000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se almacenó entonces a -80 °C para la medición posterior, por una parte, de las actividades superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en un Pentra 400 automatizado (Horiba ABX, Montpellier, Francia) utilizando los kits Ransod n° SD125 y Ransel n° RS505 respectivamente (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Reino Unido) y, por otra parte, para cuantificar las tasas de IL-6 y de TNF- α utilizando kits ELISA específicos según las instrucciones del fabricante (R & D Systems Europe, Lille, Francia). Para medir la actividad del factor nuclear NF κ B, el tejido hepático se homogeneizó en un tampón hipotónico (pH 7,9) que contenía HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, KCl 10 mM, una mezcla de inhibidores de proteasa al 1%, 0,1% de ditiotreitól e Igepal al 0,1%. Los extractos nucleares se obtuvieron entonces por homogeneización del sedimento en un tampón de lisis (pH 7,9) que contenía HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, glicerol al 10%, ditiotreitól 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasa al 1%. La actividad de NF κ B se determinó a partir de extractos nucleares utilizando una dosificación inmunológica comercial (Active Motifs, Rixensart, Bélgica).

La producción hepática y cardiaca del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se evaluó por la intensidad de la quimioluminiscencia de la lucigenina (lucigenina 10 microM), medida con un luminómetro (Perkin Elmer Wallac, Victor, Turku, Finlandia) como se ha descrito anteriormente por Sutra et al. (2007). Los resultados se expresaron en unidades relativas de luminiscencia (RLU) por mg de proteína.

40 Resultados experimentales

Absorción de alimento y ganancia de peso

La tabla 1 presenta los resultados obtenidos: Peso corporal, absorción de alimentos, colesterol plasmático, triglicéridos, actividad paraoxonasa (PON) y modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en los hámsteres que recibieron un régimen estándar con agua (STD), un régimen rico en grasas y agua (HF), un régimen rico en grasa y la espirulina (HF-Sp) o un régimen rico en grasas y la espirulina enriquecida con silicio soluble (HF-SES) durante 12 semanas.

Los hámsteres alimentados con una alimentación HF (grupo High Fat control) aumentaron su consumo alimentario de manera significativa un 27% ($p = 0,0062$) y su ganancia de peso corporal ~ 80% ($p < 0,0007$) respecto a los hámsteres alimentados con un régimen estándar (STD) (Tabla 1). Los grupos que recibieron una alimentación HF y la espirulina, enriquecida o no con el silicio, a saber, los grupos HF-SES y HF-Sp, tienen una ganancia de peso netamente inferior a la del grupo control de HF, es decir, 52% ($p = 0,0001$) y 44% ($p = 0,0008$) respectivamente, aunque no hubo diferencia de toma alimentaria entre los tres grupos (Tabla 1). Los hámsteres de los grupos HF-SES y HF-Sp tienen un consumo más bajo de alimento que los hámsteres HF. El consumo de espirulina o de espirulina enriquecida con silicio no conlleva ningún problema de salud para los animales.

55

Tabla 1

	STD	HF	HF-SES	HF-Sp
Ganancia de peso corporal (g)	32,7±5,2 ^a	58,7±7,2 ^b	28,6±4,3 ^a	33,0±2,8 ^a
Absorción de alimento (g/día)	4,9±0,2 ^a	6,2±0,6 ^b	5,5±0,6 ^b	5,5±0,5 ^b
Tasa plasmática				
TC (mmoles/L)	3,19±0,15 ^a	7,26±0,26 ^b	6,11±0,37 ^c	6,81±0,23 ^b
HDL-C (mmoles/L)	1,97±0,23 ^a	3,26±0,18 ^b	2,52±0,16 ^c	3,03±0,12 ^b
LDL-C (mmoles/L)	1,22±0,23 ^a	4,00±0,32 ^b	3,59±0,37 ^b	3,78±0,24 ^b
TG (mmoles/L)	1,06±0,06 ^a	1,73±0,27 ^b	1,14±0,03 ^a	1,60±0,29 ^{ab}
PON (U/mL)	172,8±10,2 ^a	118,2±11,6 ^b	146,9±9,9 ^{ab}	151,0±7,7 ^a
Glucosa (mmoles/L)	7,78±0,13 ^a	10,88±0,67 ^b	12,28±0,91 ^b	12,04±1,46 ^b
Insulina (pmoles/L)	155,4±43,1 ^a	456,7±79,8 ^b	127,8±43,9 ^a	178,0±30,5 ^a
HOMA-IR	9,98±2,90 ^a	22,55±4,90 ^b	9,92±0,80 ^a	12,06±2,53 ^c

5 Los valores son medias \pm SEM (n = 6). Para cada régimen alimentario, las medias asociadas a las letras diferentes difieren, $p < 0,05$. Se midieron TC: colesterol plasmático total, HDL-C: HDL-colesterol, LDL-C: LDL-colesterol, TG: triglicéridos, PON: actividad Paraoxonasa y HOMA-IR (resistencia a la insulina) después de ayuno durante una noche, al final de un periodo de tratamiento de 12 semanas.

Análisis de los lípidos plasmáticos

10 Los hámsteres alimentados con un régimen HF mostraron una dislipidemia significativa respecto a los del grupo estándar (STD) (Tabla 1). La alimentación HF-Sp no indujo una mejora de estos parámetros mientras que la alimentación HF-SES mejoró estos parámetros, excepto para el HDL-C. Se observa una disminución significativa del colesterol total y de los triglicéridos en los hámsteres que recibieron un régimen HF-SES.

15 Respecto al grupo STD, se observa igualmente en el grupo HF una tasa de glucosa plasmática en ayunas un 40% más elevada ($p = 0,0256$) y un aumento del 194% en la concentración de insulina ($p < 0,0002$), lo que da lugar a un aumento del 126% de la resistencia a la insulina, tal como se mide por HOMA-IR ($p = 0,0075$) (Tabla 1). Aunque la alimentación HF-SES o HF-Sp no mejoraron la glicemia, HF-SES indujo particularmente una disminución significativa de la insulina plasmática (72%, $p < 0,0001$) y HOMA-IR (56%, $p = 0,0010$) hasta niveles comparables a los observados en el grupo STD.

20 La actividad PON plasmática se resume en la tabla 1. En el grupo de HF, su actividad se redujo aproximadamente un 31,6% respecto al grupo STD ($p = 0,0010$). En los grupos HF-SES y HF-SP se observa una mejora significativa de la actividad PON, de aproximadamente el 26% de media respecto a los testigos.

En el grupo HF, la tasa plasmática de MCP-1 está significativamente elevada un 420% ($p < 0,0001$) respecto al grupo STD (Figura 1). Esta concentración se redujo significativamente un 28% en el grupo HF-SES ($p = 0,0380$), mientras que se observa un efecto más débil con HF-Sp.

Estrés oxidante cardiaco y hepático

25 El estrés oxidante se define como el desequilibrio entre los oxidantes y las defensas antioxidantes.

30 En el hígado, la producción de anión superóxido-(actividad NADPH oxidasa) aumentó un 98% en el grupo HF comparado con el grupo estándar ($p < 0,0001$). Esta producción disminuyó significativamente en los hámsteres que recibieron un régimen HF-SES y HF-Sp, con una disminución respectiva de un 64% y 42%, respecto a los hámsteres HF (Figura 2A). En el ventrículo cardiaco izquierdo, la producción de anión superóxido aumentó significativamente un 101% ($p < 0,0001$) en el grupo HF comparado con el grupo estándar. Esta producción disminuyó significativamente un 35% ($p = 0,006$) y 20% ($p < 0,0001$) en los hámsteres que recibieron HF-SES y HF-Sp respectivamente, por comparación con el grupo HF (Figura 2B).

Actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas

En el grupo control HF, las actividades superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) aumentaron un 35% y 75%, respectivamente por comparación con el grupo estándar ($p=0,0171$ y $p<0,0001$ respectivamente) (Figuras 3A y 3B). Sin embargo, en los grupos HF-SES y HF-Sp, la actividad de las dos enzimas cayó un 36% ($p=0,0017$) y 61% ($p<0,0001$) respectivamente para la SOD, y un 23% ($p=0,01861$) y 24% ($p=0,0049$) respectivamente para la GPx, comparado con el grupo HF.

Esteatosis e inflamación hepática

Los hámsteres del grupo estándar no muestran ningún signo histológico de esteatosis hepática (Figura 4A). Los hámsteres aterógenos alimentados sin espirulina (Figura 4B) ilustran el desarrollo de una esteatosis moderada a grave, con una inflamación indicada por la presencia extendida de células polinucleares (PN), por comparación con los animales que recibieron un régimen alimentario estándar (Figura 4A). La esteatosis hepática no se ve afectada en los animales alimentados con la espirulina o con la espirulina enriquecida con silicio (Figuras 4C y 4D), aunque las células polinucleares disminuyeron respecto a los animales control.

Las concentraciones de TNF- α y de IL-6 en el hígado del grupo HF aumentaron significativamente un 135% ($p < 0,0001$) y 64% ($p = 0,0015$), respectivamente, respecto al grupo STD (Figura 5A y B). Este estado inflamatorio de grado bajo no se invirtió más que por la administración de la espirulina enriquecida con silicio en el grupo HF-SES que presentaba niveles de citoquinas comparables a los del grupo STD.

En el grupo HF, la actividad NFkB aumentó de manera significativa (36%, $p = 0,0051$) respecto al grupo STD. Solo la administración de SES (grupo HF-SES) indujo una disminución significativa de la actividad NFkB hepática (21%, $p = 0,0259$) y consiguió el nivel del grupo STD (Figura 6).

Conclusiones

Se estudiaron los efectos de la espirulina enriquecida con silicio (SES) sobre el desarrollo de la aterosclerosis precoz inducida por un alto contenido en grasas (HF) en la alimentación de hámsteres sirios. Debido a la naturaleza multifactorial de la evolución de la aterosclerosis, se examinaron las características metabólica, oxidante e inflamatoria. Los resultados demuestran los efectos beneficiosos de la espirulina enriquecida con silicio en la prevención de trastornos lipídicos, así como en desequilibrios oxidativos e inflamatorios inducidos por la alimentación HF.

Como estaba previsto, el régimen alimentario HF, caracterizado por una tasa elevada de ácidos grasos saturados y de colesterol indujo un aumento significativo de las tasas de colesterol plasmático después de 13 semanas. La administración de SES impidió parcialmente este aumento. En un estudio precedente (Riss *et al.*, 2007), se mostró que la administración de la espirulina enriquecida con selenio a hámsteres hipercolesterolémicos no indujo una mejora de la dislipidemia después de 13 semanas.

El régimen alimentario HF indujo igualmente una resistencia a la insulina (HOMA-IR), caracterizada por una tasa de glucosa y de insulina plasmática elevada. Sin embargo, la administración de SES disminuye la insulinemia, lo que da lugar a una disminución de la resistencia a la insulina más pronunciada que después de la administración de espirulina no enriquecida con silicio. El régimen HF indujo una disminución de la sensibilidad a la insulina que está asociada generalmente a otros trastornos tales como el estrés oxidativo y la inflamación, contribuyendo los diferentes factores al desarrollo de la aterosclerosis.

Aquí, el régimen HF conllevó efectivamente un estrés oxidativo cardiaco y hepático, como demuestra la sobreproducción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La NADPH oxidasa es una fuente principal de la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y cualquier aumento de su actividad da lugar aquí a un estrés oxidativo. Esto está de acuerdo con los estudios precedentes en los que la alimentación HF indujo un aumento de la actividad y de la expresión de la subunidad p22^{phox} de la NADPH oxidasa. Aquí, la espirulina sola y SES mejoran el estado oxidativo en el hígado y el corazón, disminuyendo la producción de anión superóxido. En cada órgano, la adición de SES presentó el mejor efecto.

En el grupo HF, las actividades SOD hepática GPx se mejoraron eficazmente por la administración de espirulina enriquecida con silicio (SES), respecto al grupo standard. Sin embargo, esta inducción no impidió la sobreproducción hepática de anión superóxido, lo que sugiere que la producción de ROS podría sobrepasar los mecanismos de defensa enzimáticos, dando lugar este desequilibrio a un estrés oxidativo del hígado. Los hámsteres alimentados bien con la espirulina sola o con SES mostraron una bajada de las actividades GPx y SOD similar a las del grupo STD. La administración de la espirulina sola y de SES redujo la dependencia de los antioxidantes endógenos.

La actividad PON es otro marcador de estrés oxidativo. PON se sintetiza en el hígado y se secreta en el plasma en forma de proteína asociada a HDL y juega un papel principal en la actividad antioxidante de las HDL. Es capaz de hidrolizar los fosfolípidos oxidados y los productos de peroxidación de los lípidos, lo que inhibe la oxidación de las LDL y HDL. En consecuencia, PON podría proteger frente a la aterosclerosis, y la modulación de su actividad forma parte de las dianas terapéuticas actuales. Se sabe que el estrés oxidativo asociado a los regímenes HF disminuye la

actividad PON, aquí esta actividad se reduce considerablemente en el grupo HF. El suministro de espirulina ha permitido prevenir parcialmente dicha caída de la actividad PON, lo que refuerza su potencial antioxidante.

Globalmente, SES presentó propiedades antioxidantes como demuestra la disminución de la actividad de la NADPH oxidasa con su efecto de ahorro sobre las enzimas antioxidantes. Es bien conocido que la coexistencia de un estado de resistencia a la insulina y de estrés oxidativo hepático está ligado al desarrollo de la esteatosis hepática no alcohólica. Aquí, el grupo HF desarrolló efectivamente una esteatosis hepática, como demuestra la acumulación de lípidos representados por el análisis histológico. A pesar de la presencia de células polinucleares en el hígado, no se identificó ningún signo de fibrosis, lo que sugiere que la etapa de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) no se había alcanzado. El estado de inflamación de grado bajo en el hígado de los animales HF se confirma por la sobreproducción de citoquinas (TNF- α e IL-6), de media un 90% superior a la del grupo STD. Aunque los grupos que recibieron la espirulina sola o SES no mostraron ninguna mejora en la esteatosis, presentaron menos células polinucleares que el grupo HF. Además, la sobreproducción de TNF- α e IL-6 se previnieron y alcanzaron el nivel de referencia (STD) en el grupo SES solamente.

NF κ B, un factor de transcripción sensible al estrés oxidativo, es un regulador clave de la expresión de numerosos genes implicados en la respuesta inmunitaria e inflamatoria y las citoquinas inducidas por NF κ B contribuyen en gran medida a las enfermedades inflamatorias, incluida la aterosclerosis. La mejora del estado inflamatorio en el grupo SES, como demuestra la reducción de IL-6 y TNF- α , podría pasar por una inhibición de la actividad de NF κ B. En nuestro estudio, solo el suplemento SES previno significativamente la activación de los NF κ B a nivel del hígado y la producción inherente de citoquinas proinflamatorias. El efecto antioxidante de SES contribuyó probablemente a la inhibición de la activación de NF κ B. Además, MCP-1 juega un papel crítico en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. MCP-1, por su actividad quimiotáctica, induce una diapédesis de los monocitos a partir de la luz hacia el espacio subendotelial donde se convierten en células espumosas, iniciando la formación de estrías grasas que dirigen la formación de la placa aterosclerótica. Aquí, el suplemento con SES redujo el nivel de MCP-1 en el plasma, lo que sugiere que SES podría limitar el desarrollo de la aterosclerosis.

En conclusión, se ha demostrado que la espirulina enriquecida con silicio (SES) tiene la capacidad de inhibir los trastornos aterogénicos ligados a la alimentación. SES mejoró el nivel de resistencia a la insulina, así como el estado oxidativo e inflamatorio del hígado, que están estrechamente ligados al desarrollo de la aterosclerosis. La sensibilidad a la insulina tiene una relación de causa y efecto con la reducción del estrés oxidativo, y a la inversa. Asimismo, las propiedades antioxidantes de SES contribuyeron a mejorar el estado inflamatorio del hígado. Las dianas moleculares implicadas en estos efectos beneficiosos incluyen la inhibición de NF κ B. En conjunto, la administración de SES muestra efectos preventivos sobre los trastornos ligados a la aterogénesis, principalmente la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia, el estrés oxidativo y la inflamación de grado bajo, subrayando el valor añadido del silicio respecto a la espirulina no enriquecida con silicio (espirulina sola). Un aporte adecuado de esta espirulina de silicio enriquecida podría ser útil en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Ejemplo 2: Reactividad vascular de aortas aisladas de hámsteres sometidos a un régimen rico en grasas, con suplemento diario de espirulina, sola o enriquecida con silicio

Condiciones experimentales

Como en el ejemplo 1, los animales recibieron un régimen estándar equilibrado (STD), un régimen rico en grasas hidrogenadas y en colesterol (HF), un régimen rico en grasas hidrogenadas y en colesterol y una dosis diaria de espirulina enriquecida con silicio al 1% (es decir, 0,57 mg de silicio por kg de peso del animal) (HF-SES) o un régimen rico en grasas hidrogenadas y en colesterol y una dosis diaria de espirulina no enriquecida equivalente a la dosis de espirulina del régimen HF-SES (HF-Sp). Por «mg de silicio por kg de peso del animal, se entiende la cantidad total de silicio recibida por el animal, dosificándose esta cantidad por gravimetría.

Los experimentos de reactividad vascular se realizaron en las aortas por el método de la medición de las variaciones de tensión isométricas mediante un miógrafo (Sistema de órgano aislado, EMKA Technologie, Francia). Después de la toma, el tejido sumergido en un medio fisiológico se disecciona y limpia de los tejidos adiposo y conjuntivo. La aorta se corta entonces en cinco segmentos o anillos de 2 a 3 mm de longitud. En determinados segmentos, se destruye el endotelio por frotamiento consecutivo mediante la introducción de un palillo en la luz de la arteria. Los anillos se montan entre dos ganchos metálicos basados unidos a un captador de fuerza, sumergidos en una cubeta de miógrafo y mantenidos a 37 °C con oxigenación permanente. Cada segmento se somete a un periodo de equilibrio de 60 minutos a la tensión inicial óptima de 1g. Las variaciones de tensión se registran en respuesta a diferentes agonistas y antagonistas. La viabilidad de cada anillo se evalúa previamente por el aumento de la tensión inducido después de la adición de una dosis submáxima de fenilefrina (PE- 10 μ ml/L), validándose entonces la presencia de endotelio por la relajación consecutiva a la adición de acetilcolina (Ach- 1 μ mol/L). Después de varios lavados y un nuevo periodo de estabilización de 30 minutos, se realizan las respuestas a las dosis para evaluar en un primer momento la función contráctil en respuesta a las dosis cumulativas de fenilefrina (10 nmoles/L a 100 μ moles/L). La función endotelial se determina entonces estudiando la relajación inducida por la adición de dosis cumulativas de acetilcolina (10 nmoles/L a 10 μ moles/L). La relajación independiente del endotelio inducida por el nitroprusido de sodio (SNP) se estudia por la adición de dosis cumulativas de SNP (1 nmol/L a 100 μ moles/L) en los anillos desendotelializados y previamente

contraídos con la PE (10 μ moles/L). Cada protocolo se realizó en triplicado en tejidos que provenían de 6 animales diferentes.

Resultados experimentales

5 Como se indica en las figuras 7A y 7B, se observa una disminución de la contracción con la fenilefrina con el régimen HF en comparación con el régimen estándar (STD), previniéndose esta disminución con el suplemento con espirulinas enriquecidas (HF-SES) y no con el suplemento con espirulinas solas (HF-Sp). Esta disminución se traduce en una alteración de la función contráctil, previniéndose esta alteración con el régimen SES.

10 El estudio de la respuesta contráctil de las aortas sometidas a antagonistas de la contracción (=relajación) tales como el SNP (nitroprusiato de sodio, mimético del monóxido de nitrógeno (NO)) y acetilcolina muestra que se observa una relajación menos buena inducida por el SNP con el régimen HF (Figuras 8A y 8B). Esta disminución del efecto del SNP se traduce en una alteración de la función contráctil de las arterias. Esta alteración se previene con el régimen SES ya que la relajación inducida por el SNP es idéntica en el grupo HF-SES y en el grupo STD.

15 Se observa igualmente una relajación menos buena con la acetilcolina con el régimen HF (Figuras 8C y 8D). Este efecto sobre la relajación se traduce en una disfunción endotelial, previniéndose esta disfunción con el régimen SES. La respuesta a la acetilcolina no se modifica para los animales del grupo HF-SES respecto a los animales STD.

Conclusión

Las alteraciones de la función endotelial y de la vasomotricidad de las arterias se observan en el animal alimentado con el régimen HF. Estas alteraciones son prevenidas por un suplemento de espirulinas enriquecidas con silicio, pero no por un suplemento de espirulinas no enriquecidas con silicio.

20 **Referencias bibliográficas**

Loeper, J., *et al.*, 1979, *Atherosclerosis*, 33, 357-408.

Maehira, F., *et al.*, (2011). *Nutr. Res.*, 31, 147-56.

Refitt, D. M., *et al.*, 2003, *Bone*, 32, 127-135.

Riss, J., *et al.*, (2007). *J. Agric. Food Chem*, 55, 7962-7967.

25 Schwarz, K. (1977). *Lancet*, 1, 454-456.

Seabome, C. D., y Nielsen, F. H. (1993). *Nutr. Today*, 28, 13-18. 480

Sutra, T *et al.*, (2007) 16 de mayo;55(10):4258-63.

Vinson *et al.*, (2001), *Atherosclerosis*, 156, 67-72

Wang *et al.*, (2001), *Eur. J. Pharmacol*, 427, 285-293.

30 Organización Mundial de la Salud / World Health Organization «*Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*», 2004, WHO Library Cataloguing-in Publication- data.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse para la prevención o el tratamiento de una patología ligada al síndrome metabólico, elegida entre la diabetes de tipo 2, la obesidad nutricional, las dislipidemias, las patologías vasculares y cardiovasculares, y la inflamación.
- 5 2. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según la reivindicación 1, en la que dicha microalga es la espirulina.
3. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que se formula para administrarse por vía oral.
- 10 4. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según la reivindicación 3, caracterizada por que se presenta en una forma elegida entre: cápsula dura, capsula, comprimido, gránulo, tableta, polvo o disolución bebible.
5. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que se formula sola o con al menos un excipiente o aditivo, para administrarse como medicamento, como nutracéutico o como complemento alimentario.
- 15 6. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según la reivindicación precedente, caracterizada por que se formula con al menos un adyuvante farmacéuticamente aceptable elegido entre los espesantes, los conservantes, los perfumes, los colorantes, filtros químicos o minerales, agentes hidratantes, aguas termales.
- 20 7. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según una de las reivindicaciones precedentes, para su utilización para la prevención o la disminución de la sobrecarga ponderal, para la prevención o la disminución de la adipogénesis, o como agente antioxidante.
8. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la proporción de silicio total en dicha composición está comprendida entre el 0,05% y el 10%, de la masa seca de microalga presente en dicha composición.
- 25 9. Composición que comprende una microalga enriquecida con silicio en una forma soluble en agua, destinada a utilizarse según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la dosis de silicio administrada está comprendida entre 0,3 y 1 mg/kg/día.

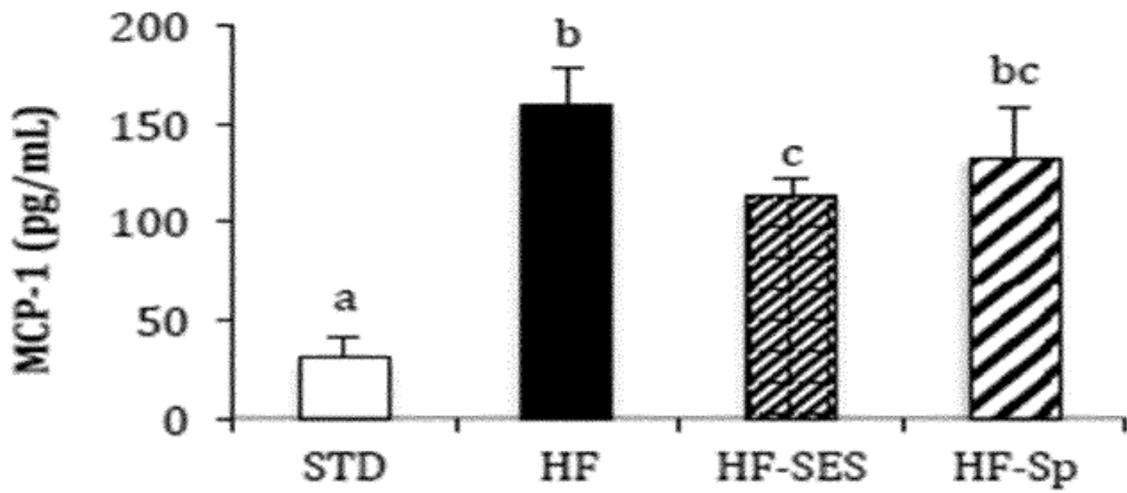


Figura 1

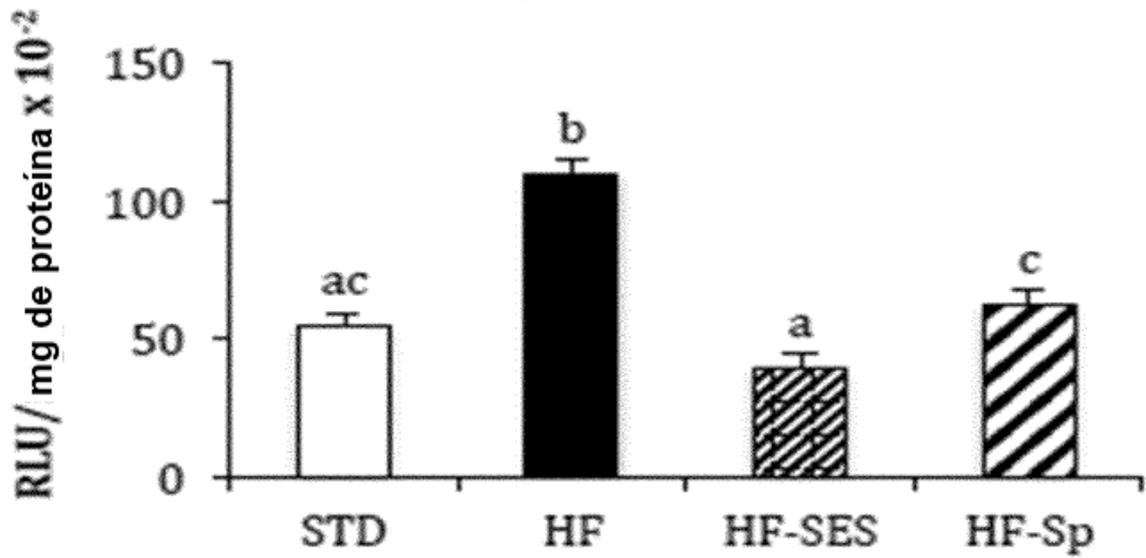


Figura 2A

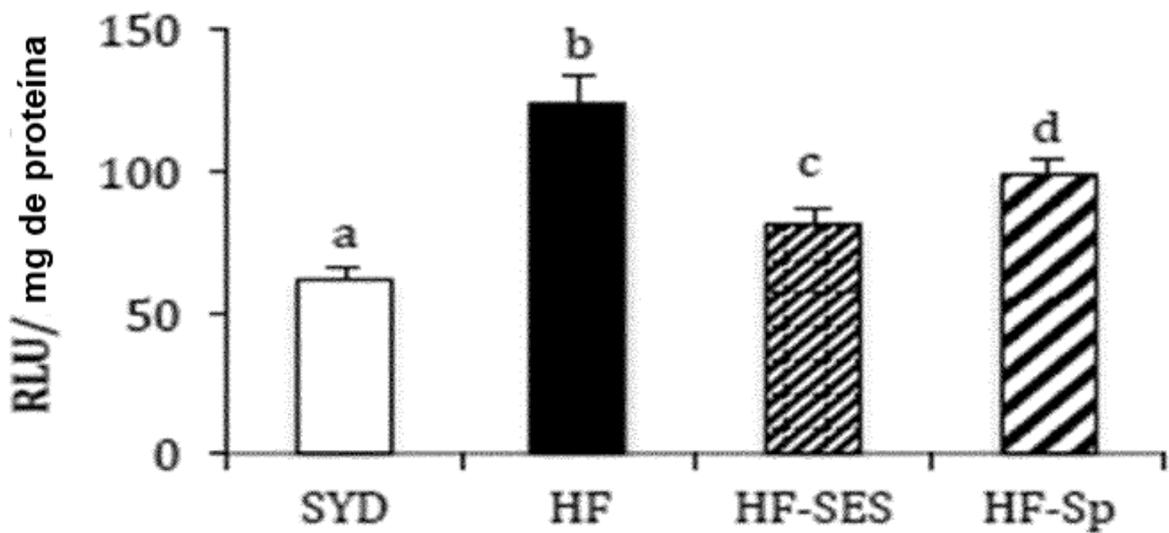


Figura 2B

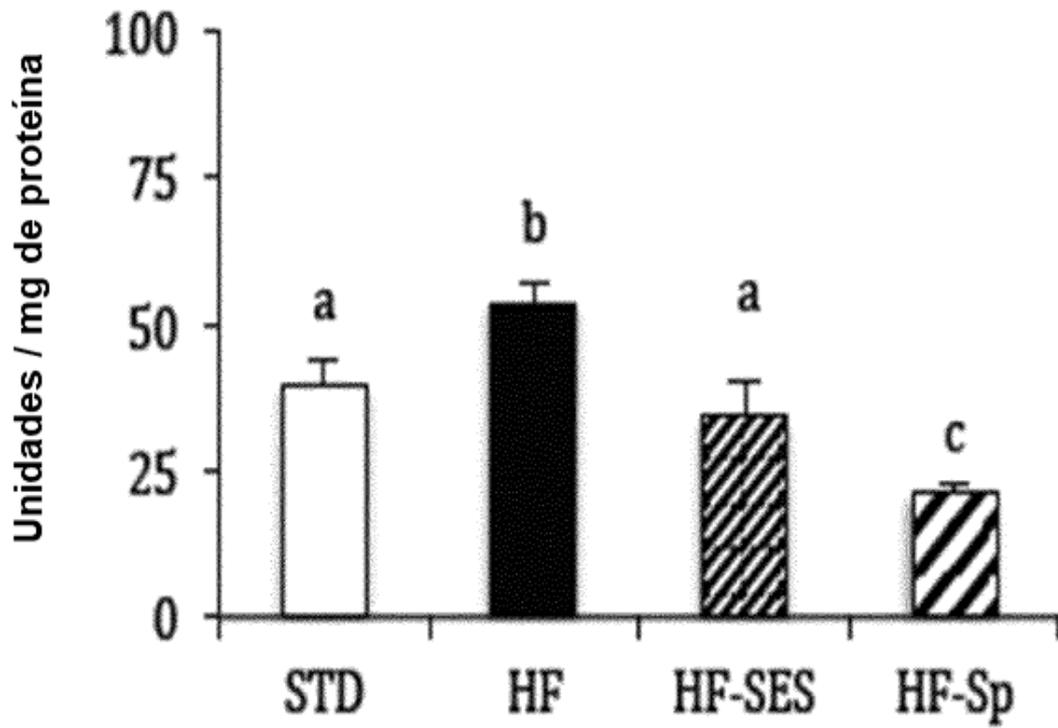


Figura 3A

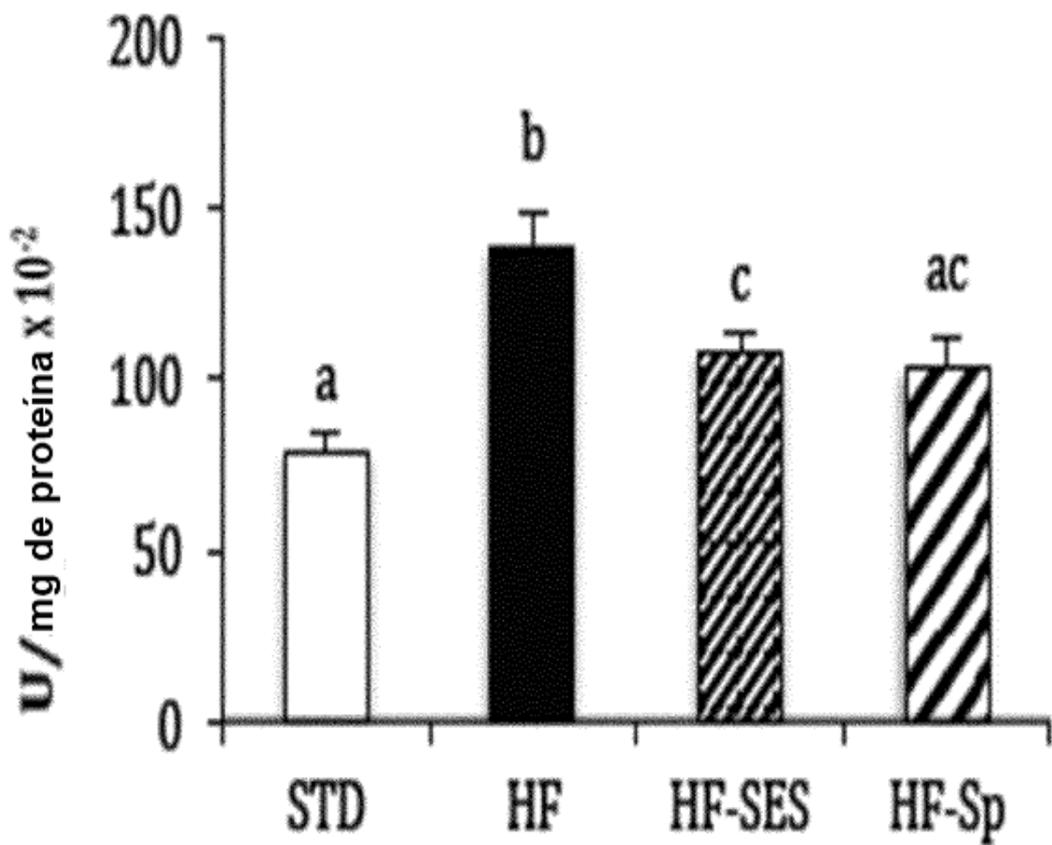


Figura 3B

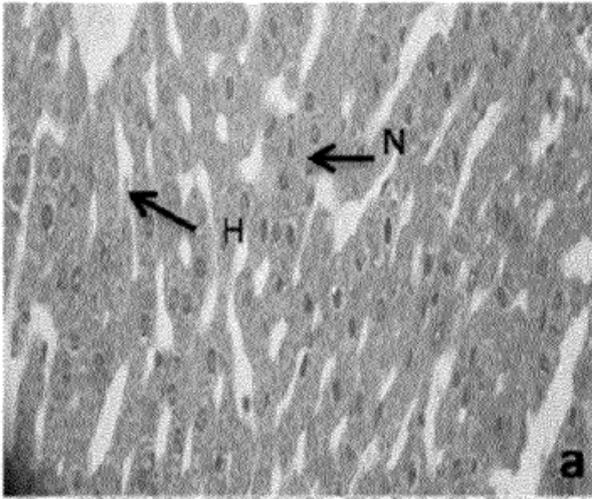


Figura 4A

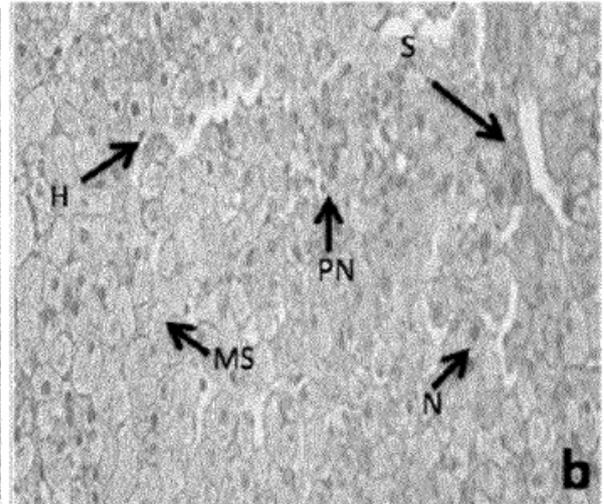


Figura 4B

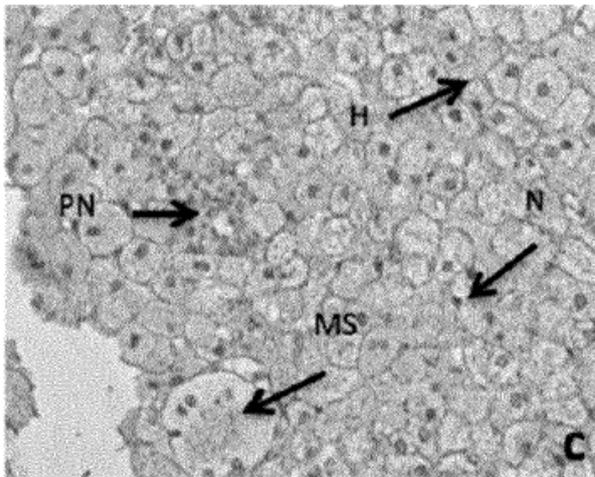


Figura 4C

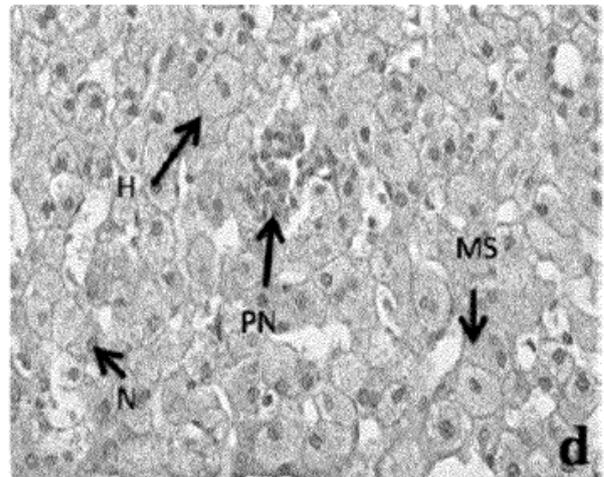


Figura 4D

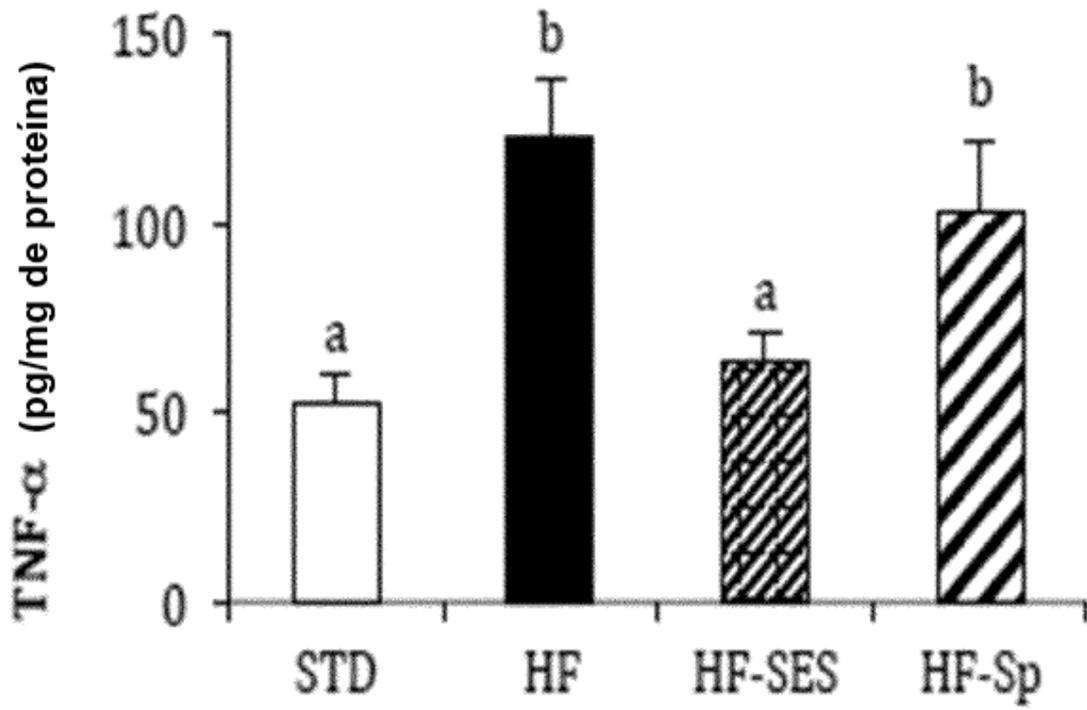


Figura 5A

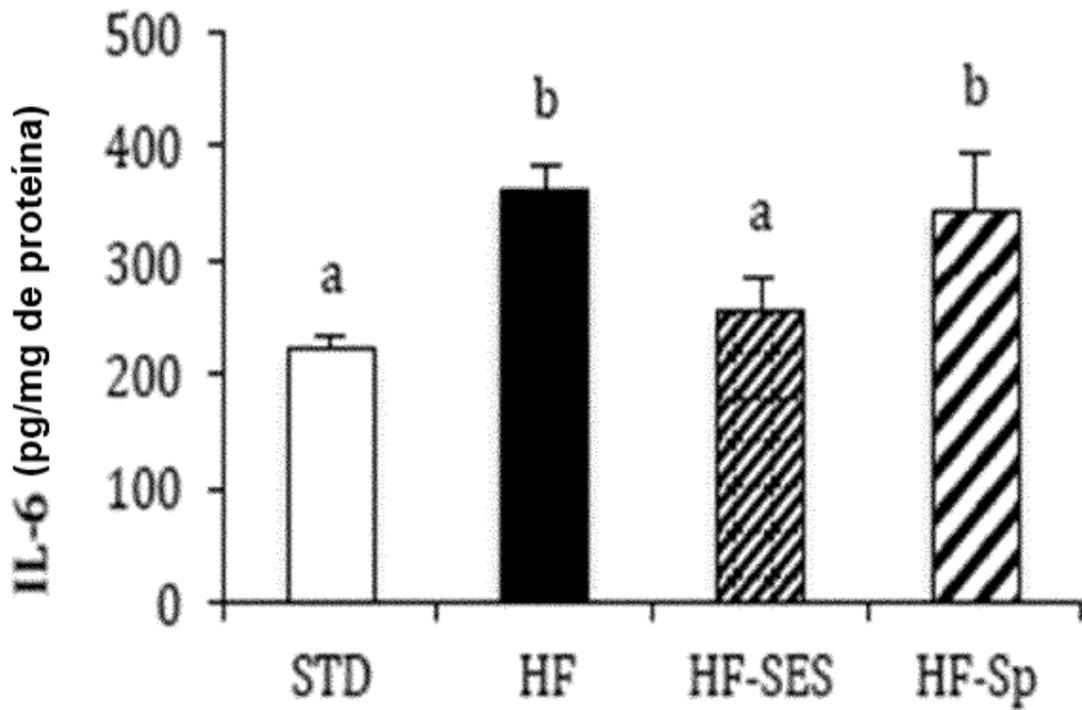


Figura 5B

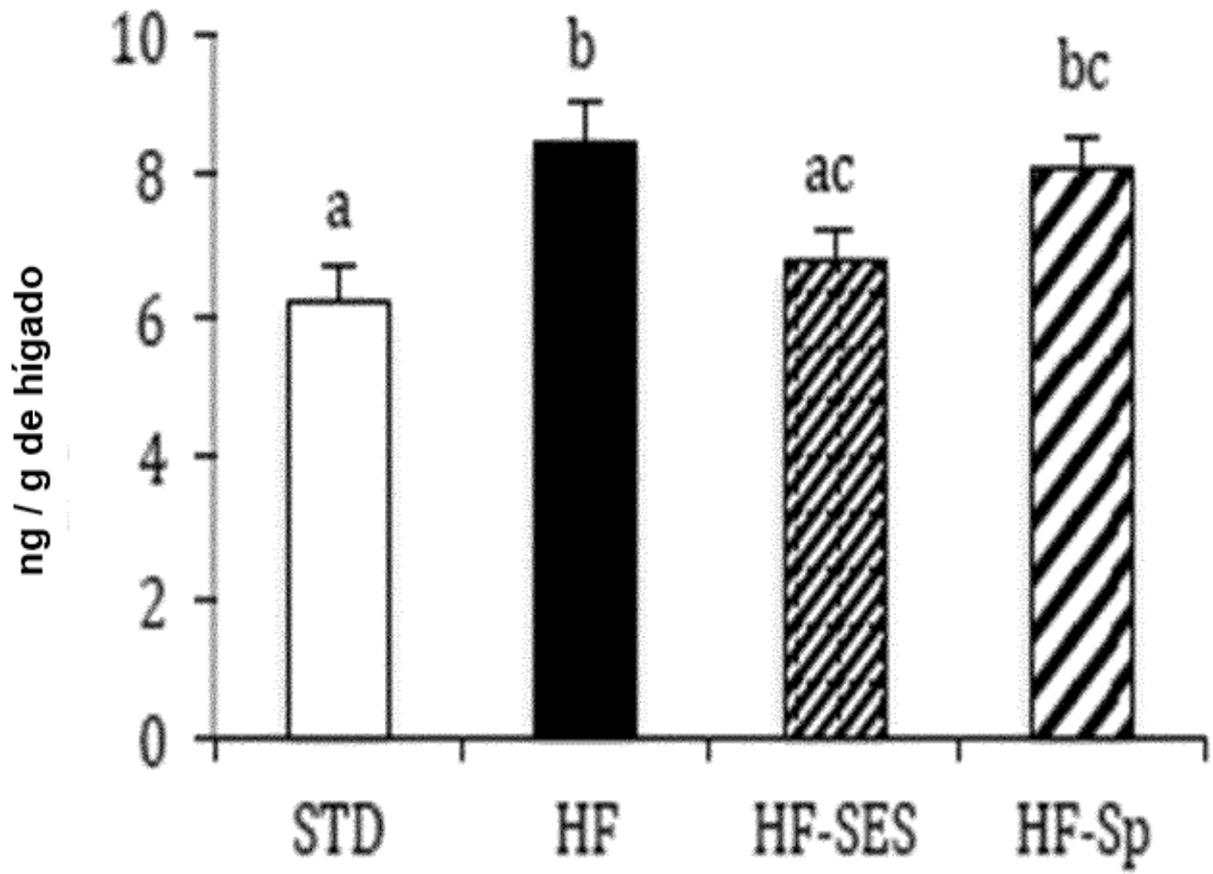


Figura 6

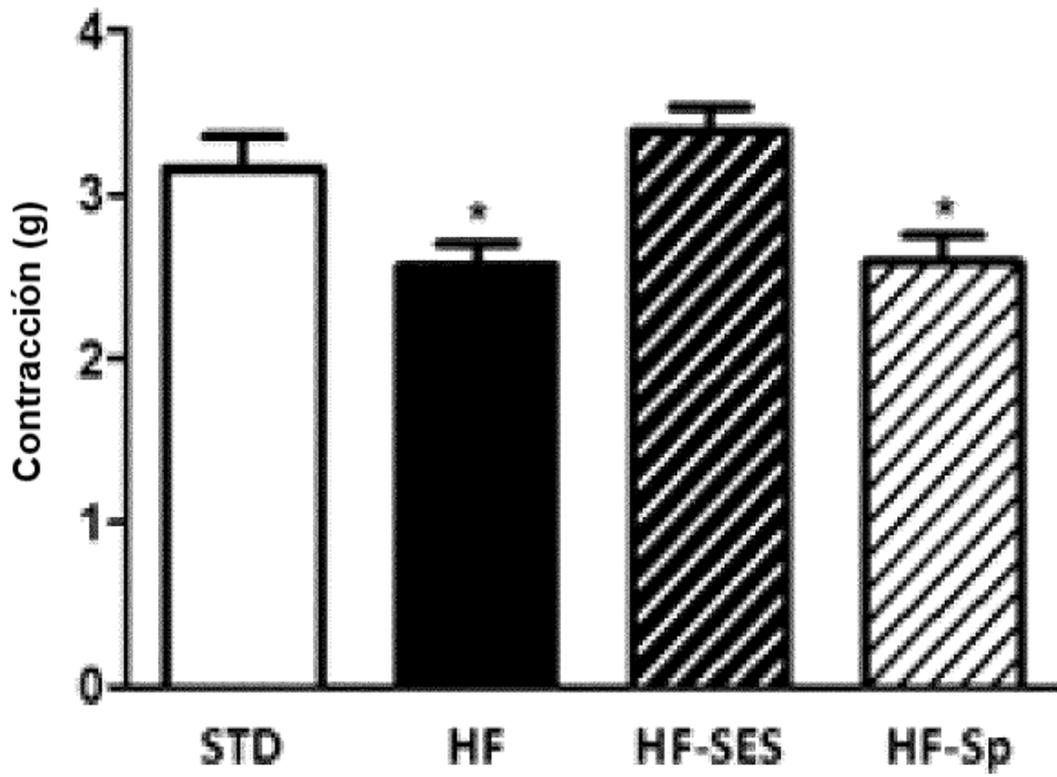


Figura 7A

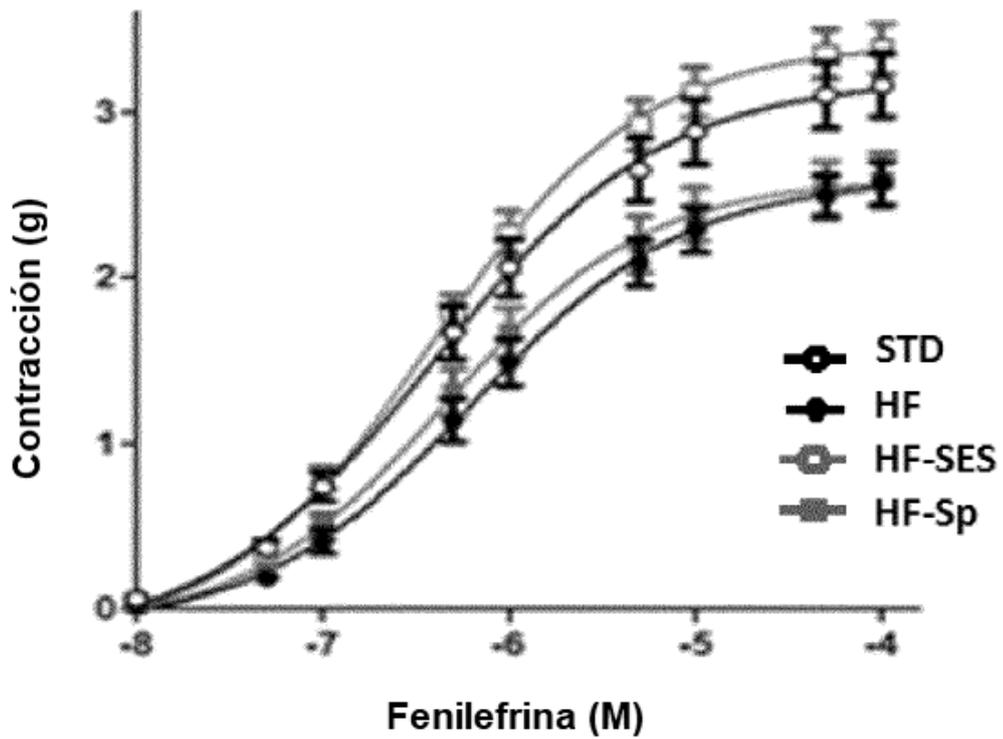


Figura 7B

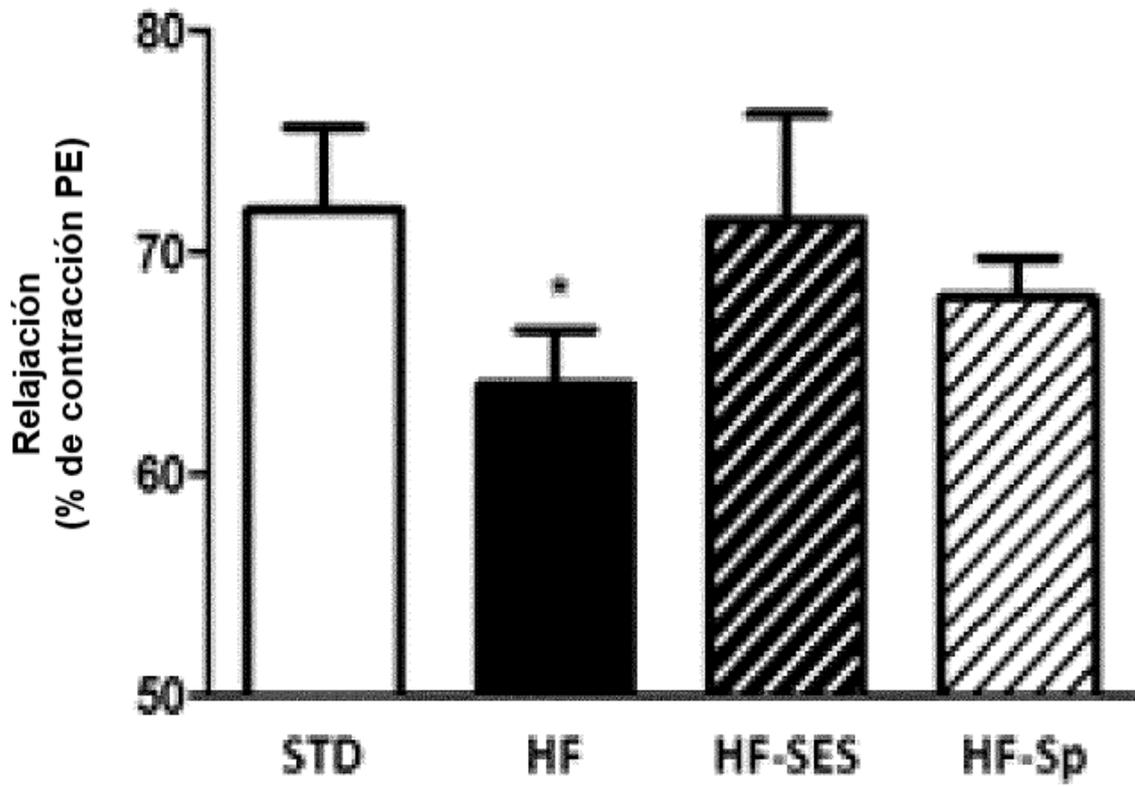


Figura 8A

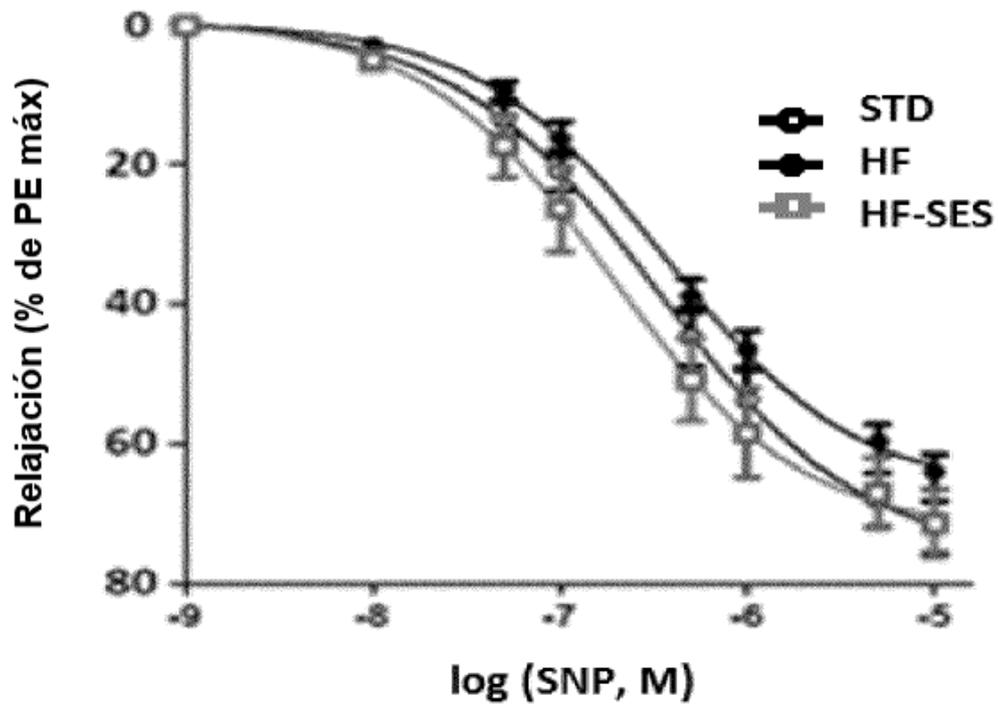


Figura 8B

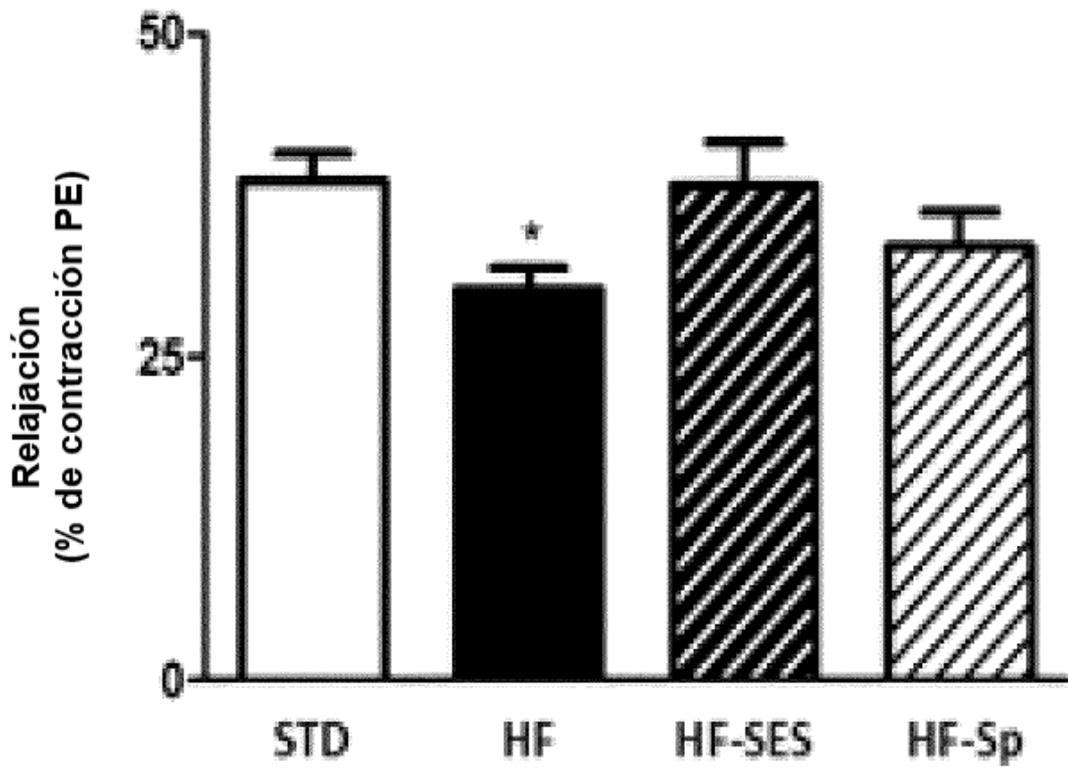


Figura 8C

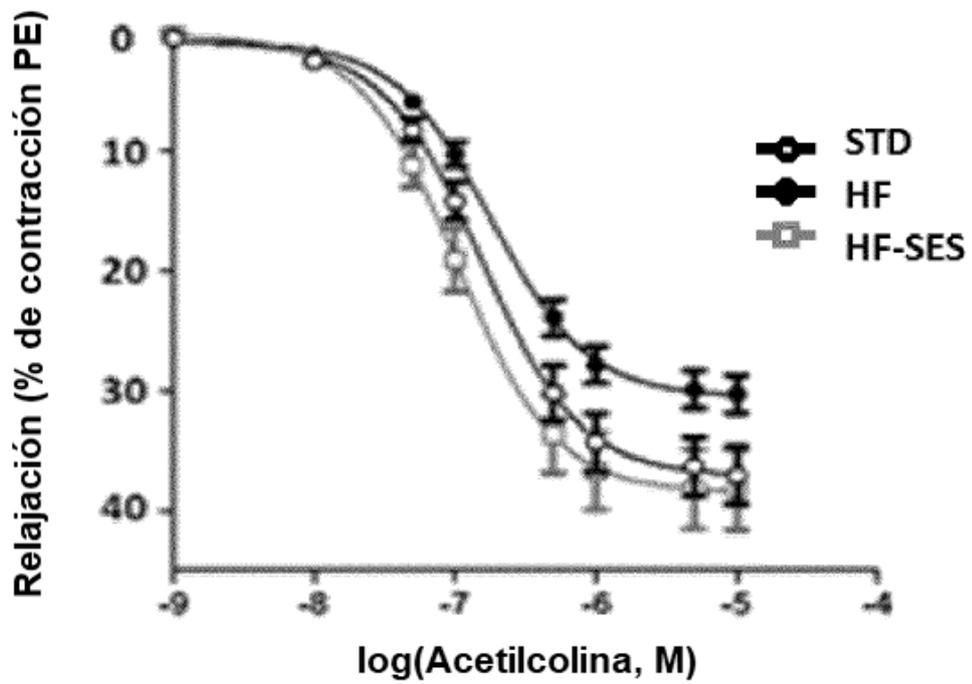


Figura 8D