

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 177**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61K 31/7048** (2006.01)

**A23L 2/39** (2006.01)

**A61P 13/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2008 PCT/FR2008/050797**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2008 WO08148995**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2008 E 08805747 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2144619**

54 Título: **Uso de hibisco para el tratamiento de infecciones urinarias**

30 Prioridad:

**07.05.2007 FR 0754905**

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

**05.03.2020**

73 Titular/es:

**NATUREX (100.0%)  
ZAC Pôle Technologique Agroparc, Montfavet  
84140 Avignon, FR**

72 Inventor/es:

**ROLLAND, YOHAN y  
DUVAL, CHARLES**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 746 177 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

Uso de hibisco para el tratamiento de infecciones urinarias

- 5 La presente invención tiene como objeto nuevos usos del hibisco, en particular en el campo farmacéutico.

El hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) es una planta muy cultivada en África occidental en la que se consume en forma de vida caliente o refrescante: el karkadé.

- 10 Los pétalos del hibisco contienen polifenoles de tipo flavonoles y flavanoles en forma simple o polimerizada. Entre estos polifenoles se encuentran los derivados de catecol en forma monomérica o dimérica (Procianidina A o B) y flavonoides. En particular, el hibisco presenta un flavonoide particular, gosispetina (3,5,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona) y su forma glicosilada, gosispina. Este flavonoide ha mostrado propiedades antibacterianas *in vitro* en ciertos microorganismos (Mounnissamy VM; Kavimani S; Gunasegaran R. Antibacterial activity of gossypetin isolated from *hibiscus sabdariffa*. The Antiseptic., marzo de 2002; 99 (3): 81-2), es decir, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- 15 Los estudios epidemiológicos muestran que más de una de cada dos mujeres experimentarán infecciones urinarias en el transcurso de su vida. El germen que está en el origen de esta infección es casi siempre un colibacilo, que coloniza de forma natural con miles de millones de ejemplares el intestino grueso cercano. Esta infección afecta mucho más a la mujer que al hombre debido a las diferencias anatómicas del sistema urinario: la uretra de la mujer, más corta, facilita la contaminación de la vejiga por las bacterias. Los hombres jóvenes se ven afectados en menor medida por esta afección. Sin embargo, los hombres de edad más avanzada con trastornos de próstata tienen un riesgo más elevado.

- 20 La cistitis, o infección baja del tracto urinario, es una inflamación del tracto urinario debido a una proliferación de gérmenes de tipo *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*...

- 25 Con la mayor frecuencia el tratamiento para esta patología suele ser de tipo antibiótico. Sucede que la infección es de intensidad débil, desaparece rápidamente con una buena higiene; en caso contrario, es necesario un tratamiento con antibióticos. Pero a toda costa es necesario evitar recidivas demasiado frecuentes, debido a la aparición de resistencias a estos medicamentos, y sobre todo debido a posibles complicaciones renales.

- 30 La presente invención tiene como objeto proporcionar un producto que permita recuperar una comodidad urinaria.

- 35 La presente invención también tiene como objeto proporcionar un nuevo medicamento destinado al tratamiento de los trastornos urinarios, y más particularmente las cistitis.

- 40 La presente invención se refiere al uso de un extracto purificado de hibisco, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de las infecciones urinarias y más particularmente cistitis.

Por prevención y tratamiento de las infecciones urinarias, se hace referencia a limitar la frecuencia de aparición de las infecciones urinarias así como a favorecer la desaparición de la patología.

- 45 Las infecciones urinarias que se mencionan en el presente documento están relacionadas con una proliferación de una cierta flora patógena, que comprende la inflamación local del tracto urinario. Más particularmente, están relacionadas con una proliferación en particular de *Escherichia coli* y de *Candida albicans*.

- 50 La expresión "infección urinaria" se refiere una patología relacionada con la presencia anómala de gérmenes microbianos en la orina.

Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de un extracto purificado de hibisco, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de cistitis.

- 55 El término "cistitis" se refiere una inflamación de origen infeccioso, crónico o agudo, de la vejiga. Esta infección urinaria específica por lo tanto se limita a la vejiga (Bergogne-Bézerin E. *et al.*, Les infections urinaires, questions d'actualité. Ed Phase 5, 2002).

- 60 Se distingue la cistitis aguda no complicada y la cistitis complicada.

La cistitis aguda no complicada se refiere a la mujer de menos de 65 años, no embarazada, no diabética, sin antecedentes urológicos particulares y sin área inmunocomprometida. La cistitis recurrente aguda no complicada se produce hasta 4 veces al año. La cistitis es recurrente cuando se produce más de cuatro veces al año.

- 65 La cistitis complicada aparece en un campo particular que comprende factores de riesgo (hombre, obesidad, diabetes, inmunodepresión, patología uronefrológica...).

*Escherichia coli* es la bacteria responsable de un 80 a un 90 % de los casos de infecciones urinarias complicadas o no en Francia, y en particular las cistitis agudas no complicadas. Las otras bacterias en cuestión de un 10 a un 20 % de los casos restantes no tienen individualmente más que una baja prevalencia.

5 En la mayor parte de los otros países europeos, la prevalencia de los gérmenes en cuestión en la cistitis aguda no complicada es aproximadamente de la encontrada en Francia. La prevalencia de las cepas de *E. coli* es ligeramente más elevada (88 %) en los países nórdicos tales como los países escandinavos y Polonia. En las infecciones urinarias complicadas, la proporción de las especies en cuestión es significativamente diferente, a menudo con las cepas de *E. coli* estando menos implicadas, en beneficio de *P. mirabilis*, otras enterobacterias o des enterococos.

10 Por lo tanto, en una encuesta reciente (Hryniewick K. *et al.*, Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infection in Poland. J Antimicrob Chemother 2001 ; 47: 773-80), realizada de forma simultánea en las dos tipos de infecciones, la prevalencia de *E. coli* era de un 88 % en las cistitis agudas no complicadas con respecto a un 66 % en las infecciones urinarias complicadas.

15 *Candida albicans* es la principal levadura responsable de infecciones urinarias tales como las cistitis. La candidiasis sigue o coexiste con una bacteriuria. En un gran estudio multicéntrico, *C. albicans* representa un 52 % de las levaduras aisladas en los casos de cistitis. *C. albicans* es la especie encontrada con mayor frecuencia.

20 La prevalencia de los principales gérmenes (bacterias y/o levaduras) responsables de las infecciones urinarias varía de acuerdo con el tipo de infección considerada.

Por ejemplo, el espectro de agentes uropatógenos que causan una cistitis complicada es mayor que el de los agentes responsables de las cistitis no complicadas.

25 Por lo tanto, un compuesto eficaz para el tratamiento de ciertas infecciones urinarias no presentará obligatoriamente el mismo grado de eficacia en una infección más específica de tipo cistitis aguda no complicada.

30 En el caso de una cistitis (aguda no complicada), el tratamiento se debe dirigir de forma específica frente a los gérmenes principalmente responsables (mecanismos de adhesión específicos, sensibilidad diferente de las cepas a las moléculas activas).

Por lo tanto, los siguientes gérmenes, *E. coli* (bacteria) y *C. albicans* (levadura) son específicamente responsables de las cistitis, en particular las cistitis agudas no complicadas.

35 La presente invención se basa en la observación de la eficacia del hibisco o de extractos de hibisco en los 2 principales gérmenes responsables de las cistitis, por su acción antimicrobiana específica.

40 Se conoce el documento de CHUANG CHIEN-HUI ET AL "Investigation of the effect of drinking roselle tea on the urine pH and blood pressure of long term foley-installed elderly" J Chinese Soc Horticultural Science, 50 (1), 2004, páginas 117-124, documento XP001537846, que describe los efectos observados en el pH urinario de una bebida de té de rosella (o *Hibiscus sabdariffa*).

45 El hibisco, en particular los pétalos, contiene numerosos ácidos orgánicos, en particular de tipo AHA (alfa-hidroxiácido). Sin embargo, estos ácidos permiten mantener ácido el pH de las orinas y por lo tanto luchar frente a la proliferación de las bacterias en el tracto urinario.

50 Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el uso de hibisco o de un extracto bruto o purificado de hibisco permite mantener las orinas a un pH inferior a 7, de preferencia inferior o igual a 6, y en particular a un pH comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6, e incluso de preferencia de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6.

55 El hibisco o un extracto bruto o purificado de hibisco se puede usar con el fin de encontrar una comodidad urinaria. En efecto con el mantenimiento del pH de las orinas a un valor inferior a 7 permite crear un medio desfavorable para el desarrollo de las bacterias.

De forma ventajosa, el extracto purificado de hibisco permite enriquecer las orinas en polifenoles específicos del hibisco, estos polifenoles presentando una actividad antimicrobiana y siendo en particular antocianos o proantocianidinas.

60 La composición química del hibisco es rica en ácidos orgánicos, en antocianos, en polifenoles de tipo proantocianidinas y flavonoides antibacterianos. Entre los antocianos presentes en el hibisco, se pueden mencionar los siguientes: delphinidina-3-O-sambubiósido, delphinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-sambubiósido y cianidina-3-O-glucósido. Entre los flavonoides, se pueden mencionar la gospipetina y su forma glicosilada, la gospipina mencionadas anteriormente.

65 La presente invención también se refiere al uso, tal como se ha definido anteriormente, en el que el extracto

purificado de hibisco se encuentra en forma de un complemento alimentario.

Un complemento alimentario de ese tipo se puede presentar en particular en forma de cápsulas de gelatina, comprimidos, cápsulas, polvos solubles (sobrecitos o barritas) o bebidas (en forma concentrada o lista para beber).

5 Este complemento alimentario por lo tanto se puede usar por ejemplo para mujeres que desean encontrar una comodidad urinaria. También se puede usar para prevenir los malestares urinarios y sus recidivas.

10 Un uso ventajoso de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que el hibisco proviene de toda la planta, en forma fresca o seca, o proviene de sus flores.

Por lo tanto el hibisco se puede usar en el contexto de la presente invención en forma fresca o seca, sea cual sea su granulometría. Por lo tanto, el hibisco puede estar, por ejemplo, (crio)triturado o micronizado.

15 El uso de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que el extracto bruto o purificado de hibisco es un extracto en forma líquida, en un disolvente constituido por alcohol o una mezcla hidroalcohólica, o un extracto en forma seca, sea cual sea el medio de secado (en particular por eliminación de agua en un flujo de aire caliente, por nebulización, por evaporación, por sublimación, por deshidratación, por adsorción sobre un soporte).

20 Los extractos de hibisco purificados se tienen con los medios habituales del experto en la materia.

25 El extracto bruto se obtiene poniendo la planta (hibisco) en presencia de un disolvente, tal como se ha definido anteriormente, para una etapa de extracción, separando la planta y el disolvente con el fin de obtener un extracto bruto en forma líquida. Con el fin de obtener un extracto bruto en forma seca, el extracto bruto en forma líquida se seca por ejemplo mediante eliminación del agua en un flujo de aire caliente, por nebulización, por evaporación, por sublimación, por deshidratación, por adsorción sobre un soporte.

30 El extracto purificado se obtiene a partir del extracto bruto obtenido en la etapa precedente con el fin de aumentar el título de principio activo. Para hacer esto, dicho extracto bruto se somete a una etapa de purificación ya sea mediante cromatografía ya sea mediante extracción de líquido/líquido con un disolvente orgánico no miscible en agua.

35 Por lo tanto, a partir de un extracto bruto en forma líquida en fase acuosa, obtenido ya sea mediante extracción en bruto de la planta con agua, ya sea mediante extracción en bruto con alcohol y desolvatación, ya sea mediante puesta resolución del extracto bruto en polvo en agua, se puede aplicar un método de purificación mediante técnicas de cromatografía.

40 Este extracto bruto se deposita en resinas de cromatografía. Los principios activos buscados (polifenoles) permanecen fijados en la resina, que a continuación se lava con agua o con la ayuda de una mezcla de agua-disolvente orgánico que no resolubiliza los principios activos buscados. Por último, los principios activos se recuperan de la columna por elución con un disolvente orgánico por ejemplo de tipo alcohol (metanol o etanol por ejemplo) o cetona. Este proceso permite recuperar más de un 90 % de los principios activos presentes en la fase acuosa de partida.

45 Los extractos purificados se pueden manipular de forma idéntica en forma líquida en fase alcohólica, o en forma líquida en fase acuosa después de desolvatación, o en forma líquida en fase acuosa concentrada, o en forma seca (forma pulverulenta).

50 Las resinas de cromatografía usadas son de tipo adsorción/desorción, por ejemplo de tipo copolímero de divinilbenceno/estireno, poliestirénico o polimetacrílico, comercializados en particular por las compañías Rohm & Haas o Mitsubishi Chemical.

55 La presente invención también se refiere a un medicamento que contiene el extracto purificado de hibisco para el tratamiento o la prevención de los trastornos urinarios, y más particularmente para el tratamiento o la prevención de la cistitis.

60 La presente invención también se refiere a un extracto concentrado de hibisco, en forma líquida o seca, con un título de polifenoles superior o igual a un 50 %, de preferencia comprendido de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 %, e incluso de preferencia de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 100 %.

Más particularmente, el extracto concentrado de acuerdo con la invención contiene al menos un 90 % de polifenoles totales, y más particularmente de aproximadamente un 20 a aproximadamente un 50 % de catequinas.

65 Los polifenoles se dosifican mediante HPLC usando como eluyente un gradiente de los disolventes A: agua/ácido acético (99/1), B: agua/ácido acético (94/6) y C: agua/acetonitrilo/ácido acético (65/30/5). El gradiente aplicado es el siguiente:

Tiempo (min)	% de A	% de B	% de C
0	100	0	0
15	0	100	0
30	0	100	0
50	0	90	10
60	0	80	20
80	0	70	30
120	0	0	100
122	100	0	0
140	100	0	0

El caudal aplicado es de 0,5 ml/min (detector UV: 280 nm; columna : fase injertada C18).

5 Entre los polifenoles, se pueden mencionar los flavonoles y los flavonoides por una parte y las flavonas por otra parte.

10 Entre los flavonoles y los flavonoides, se pueden mencionar en particular los siguientes compuestos: hibiscetina, hibiscetrina (hibiscetina-3-O-glucósido), gosipetina, gosipetrina (gosipetina-7-O-glucósido), gosipina (gosipetina-8-O-glucósido), gositrina (gosipetina-3-O-glucósido), sabdaritrina y su forma hidrolizada, sabdaretina (hidroxiflavona), quercetina o miricetina.

Entre las flavonas, se pueden mencionar en particular los siguientes compuestos: luteolina o glicósido de luteolina.

15 De acuerdo con modo de realización particular, el extracto concentrado de hibisco de acuerdo con la invención presenta un título de antocianos inferior a un 8 %.

20 De preferencia con el extracto concentrado de hibisco de la invención se caracteriza por que presenta un título de antocianos superior o igual a un 8 %, de preferencia comprendido entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 20 %, e incluso de preferencia de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 20 %.

Los antocianos se clasifican por HPLC usando como eluyente un gradiente de los disolventes B:ácido fosfórico al 3 % (v/v) en agua Ultra-pure (Millipore) y C:metanol. El gradiente aplicado es el siguiente:

Tiempo (min)	B (%)	C (%)
0	77	23
35	74	26
70	60	40

25 El caudal aplicado es de 1,0 ml/min (detección: 525 nm; columna: fase injertada C18).

Más particularmente, el extracto concentrado de hibisco de la invención se caracteriza por que presentaba un título de antocianos de acuerdo con el siguiente reparto:

delfinidina-3-O-sambudiósido (hibiscina)	4 - 6 %
delfinidina -3-O-glucósido	0 - 2 %
cianidina-3-O-sambudiósido (gosipicianina)	0 - 4 %
cianidina-3-O-glucósido	0 - 1 %

30 Además, el extracto concentrado de hibisco de la invención se caracteriza por que presenta un título de ácidos orgánicos e inferior o igual a un 30 %.

35 Más particularmente, el extracto concentrado de hibisco de la invención puede comprender ácido clorogénico con un título superior a un 1 % y ácido quínico con un título inferior a un 5 %.

Entre los ácidos orgánicos, también se pueden mencionar los siguientes compuestos: ácido protocatéquico, ácido

cítrico, ácido málico, ácido tártrico, ácido hibiscico o ácido ascórbico.

5 La presente invención también se refiere una composición farmacéutica que comprende, a modo de sustancia activa, un extracto concentrado de hibisco tal como se ha definido anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere un complemento alimentario que comprende un extracto concentrado de hibisco tal como se ha definido anteriormente, en asociación con un vehículo aceptable.

## 10 Ejemplos

### **1) Preparación de extractos de hibisco:**

#### a) Preparación de un extracto bruto de hibisco (ejemplo de referencia):

15 1 kg de flores de hibisco secas se extrae mediante maceración en agua a 5 °C durante 2 horas.

El disolvente cargado se separa de la materia sólida en suspensión, se filtra y a continuación se concentra.

20 El concentrado constituye un extracto bruto líquido, que se puede transformar en extracto bruto en polvo por eliminación del disolvente, por ejemplo mediante secado a vacío.

El rendimiento másico es del orden de un 30 a un 40 % en p/p.

25 El análisis de este producto muestra la presencia de ácidos orgánicos, polifenoles de tipo proantocianidoles, flavonoides y antocianos.

Los análisis muestran que este extracto tiene un título de más de un 20 % de proantocianidinas.

#### 30 b) Preparación de otro extracto bruto de hibisco (ejemplo de referencia):

1 kg de flores de hibisco frescas se extrae mediante maceración en etanol al 90 % durante 2 horas.

35 El disolvente cargado se separa de la materia sólida en suspensión, y a continuación se filtra.

Este producto constituye un extracto bruto líquido, en el que también se encuentran todos los compuestos buscados, pero con otro reparto.

40 Este producto líquido se puede destilar, a continuación concentrar, y opcionalmente secar con los medios habituales, por ejemplo vacío con una acción térmica.

#### c) Preparación de un extracto purificado de hibisco:

45 1 kg de flores de hibisco secas se extrae mediante maceración en etanol al 90 % durante 2 horas.

El disolvente cargado se separa de la materia sólida en suspensión, se filtra, a continuación se destila y se concentra.

50 Este concentrado se somete una etapa de purificación mediante cromatografía sobre resina de adsorción/desorción adecuada para los polifenoles.

El eluato entonces constituye el extracto purificado, que también se debe conservar en forma líquida o seca.

55 Se obtiene un extracto purificado de hibisco que contiene hasta un 9 % de antocianos y hasta un 50 % de polifenoles, medidos por HPLC.

#### d) Preparación de otro extracto purificado de hibisco:

60 A partir de un extracto bruto obtenido por ejemplo como se ha realizado anteriormente (párrafo a)), en particular en forma concentrada, se puede aplicar una etapa de purificación mediante extracción de líquido/líquido con la ayuda de un disolvente no miscible en agua, del tipo por ejemplo n-butanol o acetato de etilo.

La fracción purificada se desolvata y contiene hasta un 65 % de polifenoles.

65 Los análisis muestran que este extracto tiene un título de más de un 50 % de proantocianidinas.

En todos los casos de extractos de hibisco en forma líquida, los extractos se pueden estabilizar con aditivos de tipo glicerol o glicol, de tipo conservantes, o cualquier otro ingrediente de formulación.

**2) Ejemplos de formulaciones galénicas:**

5

a) Preparación de una bebida lista para beber:

	%
Agua	csp
Extractos de hibisco	1
Extractos de rabos de cereza	1
Extractos de Reina de los prados	1
Extractos de Té verde	1
Corrector de acidez (ácido cítrico)	2
Aroma natural de limón verde	0,2

10 El hibisco permite luchar contra la aparición de una flora bacteriana patógena en el tracto urinario, los otros extractos favorecen la eliminación del agua aumentando la diuresis, lo que contribuye al efecto positivo general de la bebida contra las patologías infecciosas del tracto urinario.

b) Preparación de una cápsula de gelatina:

Extracto de hibisco bruto	210 mg
Celulosa Microcristalina	25 mg
Estearato de magnesio	20 mg
Dióxido de silicio	10 mg
Total	265 mg

15

Este tipo de formulación galénica permite sin problema proporcionar los 36 mg de proantocianidinas al día propuestos por la AFSSA.

**3) Resultados microbiológicos:**

20

Se llevaron a cabo estudios microbiológicos con el fin de demostrar la eficacia de los extractos de hibisco de la invención (purificados o no) en las infecciones urinarias y más particularmente en las cistitis, en particular las cistitis agudas no complicadas.

25

**Estudio n.º 1 - evaluación de la eficacia de la conservación antimicrobiana de un extracto de hibisco (UtiRose) - Protocolo de la Farmacopea US XXV - 2 cepas - 7 días**

Este primer estudio tiene como objeto evaluar la duración de la validez de un sistema conservantes con el fin de asegurar que la actividad de conservación no se modifique a lo largo del periodo de conservación.

30

Las cepas usadas son *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Los medios de cultivo son medios de cultivo de nueva generación (medios de conservantes, medios de mantenimiento de las cepas, medios de incubación y de recuento validados) tal como los que se mencionan a continuación:

35

Medios de los conservantes:

- Caldo de cultivo de cerebro/corazón
- Caldo de cultivo LT 100
- Solución de triptona-sal

40

Medios de mantenimiento de las cepas:

- Gelosa LT 100
- Gelosa Tripto-caseína de soja
- Gelosa de Sabouraud

45

Medios de incubación y de recuento (en placas de Petri):

- Sobre gelosa LT 100 para las cepas bacterianas
- Sobre gelosa de Sabouraud para los hongos y las levaduras

Un control de cada lote de medio usado para la realización de este ensayo se incubó 5 días a 22 °C para verificar su esterilidad.

10 **Metodología:**

El producto que se va a analizar se contamina artificialmente con microorganismos apropiados. Entre cada medición, las preparaciones inoculadas se mantienen a 22 °C y se protegen de la luz durante 28 días.

- 15 Se llevan a cabo cuatro recuentos después de la inoculación a los 7 días, 14 días, 21 días y 28 días (numeración de la flora contaminante llevada a cabo mediante diluciones sucesivas de 1 g de producto sobre gelosa nutritiva).

En cada tiempo de la medición:

- 20
- 1 g (+/- 0,1 g) de producto contaminado se es en 9 ml de caldo de cultivo LT 100 (+/- 0,2 ml)
  - revitalización durante 30 min, temperatura ambiente. El producto sometido a ensayo es un extracto purificado de hibisco tal como se ha definido anteriormente.

25 **Resultados en reducción logarítmica**

Concentraciones medidas (UFC/g)

Cepas	Inóculo	J7
<i>E. coli</i>	2,80 . 10 <sup>7</sup>	0,00 . 10 <sup>0</sup>
<i>C. albicans</i>	1,60 . 10 <sup>7</sup>	6,30 . 10 <sup>2</sup>

Reducciones obtenidas (fuera del inóculo)

Cepas	Inóculo	J7
<i>E. coli</i>	7,45	7,45
<i>C. albicans</i>	7,20	4,40

30 **Interpretación y conclusión:**

El sistema conservante es eficaz si:

- 35
- para las bacterias: en el J14, debe haber una reducción de al menos 2 log con respecto al inóculo de partida. La concentración de microorganismos obtenida el J14 debe permanecer idéntica o inferior durante los 14 días restantes.

- 40
- para los mohos / levaduras: los J14 y J28 la concentración debe ser igual o inferior a la concentración inicial de del inóculo

Las reducciones logarítmicas están de acuerdo con las exigencias de la Farmacopea en 7 días.

Este primer estudio muestra que los extractos de hibisco de acuerdo con la invención tienen una eficacia significativa en la reducción de una contaminación microbiana inicial (disminución de la población microbiana), así como tanto con respecto a *E. coli* como a *C. albicans*.

45 **Estudio n.º 2 - evaluación de la eficacia de la conservación antimicrobiana de un extracto de hibisco (UtiRose) - Protocolo de la Farmacopea US XXV - 1 cepa**

50 La cepa usada es *Escherichia coli*.

Los medios de cultivo son idénticos a los usados en el estudio n.º 1.

55 **Metodología:**

El producto que se va a analizar se contamina artificialmente con microorganismos apropiados. Entre cada medición,

las preparaciones inoculadas se mantienen a 20 °C y se protegen de la luz durante 4 días.

Se llevan a cabo cuatro recuentos después de la inoculación a 1 día, 2 días, 3 días y 4 días (numeración de la flora contaminante llevada a cabo mediante diluciones sucesivas de 1 g de producto sobre gelosa nutritiva).

5

En cada tiempo de la medición:

- 1 g (+/- 0,1 g) de producto contaminado se es en 9 ml de caldo de cultivo LT 100 (+/- 0,2 ml)
- revitalización durante 30 min, temperatura ambiente. El producto sometido a ensayo es un extracto purificado de hibisco tal como se ha definido anteriormente.

10

### **Resultados en reducción logarítmica**

Concentraciones medidas (UFC/g)

Cepas	Inóculo	J1	J2	J3	J4
<i>E. coli</i>	2,80 . 10 <sup>7</sup>	3,40 . 10 <sup>2</sup>	0,00 . 10 <sup>0</sup>	0,00 . 10 <sup>0</sup>	0,00 . 10 <sup>0</sup>

15

Reducciones obtenidas (fuera del inóculo)

Cepas	Inóculo	J1	J2	J3	J4
<i>E. coli</i>	7,45	4,92	7,45	7,45	7,45

### **Interpretación y conclusión:**

20 El sistema conservante es eficaz sobre la cepa sometida a ensayo de polo con las recomendaciones de la Farmacopea.

Los extractos de hibisco mostraron una actividad antimicrobiana significativa, en las cepas de *E. coli*.

25 El efecto antimicrobiano en *E. coli* aparece inmediatamente y permite obtener una descontaminación total en las 24 horas que siguen al comienzo del tratamiento: el tratamiento permitió una reducción en 24 h de 10<sup>5</sup> de la población bacteriana inicial.

### **Estudio n.º 3 – Eficacia y aceptabilidad de un complemento alimentario en la comodidad urinaria**

30

#### **1 - Resumen del protocolo**

Objeto de estudio: evaluar la eficacia y la aceptabilidad de un ingrediente alimentaria (extractos de hibisco tal como se han definido anteriormente) para mejorar la comodidad urinaria y prevenir las infecciones urinarias, realizado en forma de un complemento alimentario en el transcurso de un periodo de 24 semanas, aproximadamente 60 mujeres repartidas en 3 grupos que prueban o bien 1 producto de control sin principio activo (placebo), o bien un producto para el ensayo con una dosis n.º 1 del ingrediente, o bien otro producto para el ensayo con una dosis n.º2 del ingrediente.

35

40 Los productos se distribuyen en envases neutros y codificados por el médico en función del grupo atribuido de forma aleatoria (reparto aleatorio en 3 grupos de 20 personas).

Los criterios de inclusión para el reclutamiento de los voluntarios son los siguientes:

- 45 • Mujeres con edades de 18 a 55 años
- Mujeres que se quejan de incomodidad urinaria y que declaran tener infecciones urinarias repetidas
- 

Posología: 2 cápsulas al día

Complemento alimentario 1: UtiRose regular (extracto de hibisco)

50 Complemento alimentario 2: UtiRose premium (extracto de hibisco purificado)

Producto de control: Maltodextrina

Se trata de un ensayo controlado, tratado de forma aleatoria y con doble ocultación. Los 3 grupos prueban los productos en paralelo le.

55

#### **2 - Criterios de evaluación**

Los parámetros de evaluación son de 2 tipos: por una parte una medición objetiva, es decir, el número de sucesos por molestias urinarias declaradas a lo largo del período de ensayo, y por otra parte la medición subjetiva, a través

de la evaluación de la eficacia percibida, de la aceptabilidad de la tolerancia de los productos.

El examen médico se lleva a cabo por medio de visitas médicas después de 84 y 168 días de consumo de los productos de ensayo.

5 Seguimiento de la comodidad urinaria de forma diaria se anota en un cuaderno de observaciones que permite recoger todo suceso de molestias ordinarias y las infecciones urinarias declaradas opcionalmente.

10 Un cuestionario de evaluación de la eficacia percibida se distribuye a los voluntarios los días J4 y J168. permite evaluar la eficacia de los productos de ensayo con respecto a la comodidad urinaria y con respecto a la prevención de las infecciones urinarias.

15 La tolerancia del producto del ensayo es evaluado por el médico con el fin de recoger todo efecto eventual indeseable relacionado con el consumo del complemento alimentario.

Al final del estudio, los voluntarios juzgaron la practicidad del empleo de los productos informaron de sus impresiones generales a través de las principales cualidades y los principales defectos que pudieran percibir en el complemento alimentario.

### 20 **3 - Resultados**

#### *Datos objetivos*

25 El número de infecciones urinarias disminuyó de forma significativa en los 2 grupos que habían consumido el producto activo purificado y no purificado mientras que no disminuyó de forma significativa en el grupo de control.

#### *Autoevaluaciones*

30 Una reducción significativa de las molestias urinarias se observó para los 2 extractos de hibisco, en términos de frecuencia, dolor, duración, frecuencia de las micciones, olor de las orinas.

Una mejora significativa del estado de las mucosas también se observó para los 2 extractos de hibisco, en términos de irritación, inflamación, pruritos, sequedad, mucosas sanas o no.

#### 35 *Datos subjetivos*

La acción de los extractos de hibisco fue considerado eficaz por el médico con respecto a la prevención de las infecciones urinarias y la importancia de la molestia urinaria fuera de las infecciones.

40 De una manera general, los voluntarios consideraron satisfactorios los tratamientos con los extractos de hibisco, para los siguientes aspectos:

- Mejora de la comodidad urinaria
- 45 • Respeto de la flora microbiana natural
- Eficacia para la prevención de las molestias y las infecciones urinarias
- 50 • Disminución clara de las infecciones urinarias
- Disminución de la intensidad de los dolores durante las infecciones
- Disminución de la duración de las infecciones urinarias
- 55 • Reducción de los pruritos e irritaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un extracto purificado de hibisco con un título de polifenoles superior o igual a un 50 % y un título de ácidos orgánicos inferior o igual a un 30 %, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de infecciones urinarias relacionadas con la presencia de *Escherichia coli* y *Candida albicans*, dicho extracto purificado de hibisco siendo obtenido después de la realización de las siguientes etapas:
- 10 - Extracción mediante maceración de la planta entera en forma fresca o seca, o de las flores de hibisco, en un disolvente constituido por alcohol o por una mezcla hidroalcohólica, a continuación  
 - Separación del disolvente y de la planta con el fin de obtener un extracto bruto, a continuación  
 - Purificación del extracto bruto mediante cromatografía sobre una resina de adsorción/desorción, o mediante extracción de líquido/líquido en un disolvente orgánico no miscible en agua.
- 15 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de la cistitis.
3. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el extracto purificado de hibisco está en forma de un complemento alimentario.
- 20 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el extracto purificado de hibisco es un extracto en forma líquida o seca.
- 25 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el extracto purificado de hibisco, tiene un título de polifenoles superior o igual a un 50 %, y un título de antocianos superior o igual a un 8 %.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** el extracto purificado de hibisco tiene un título de antocianos de acuerdo con el siguiente reparto:
- Delfinidina-3-O-sambudiósido (hibiscina) 4-6 %
  - Delfinidina-3-O-glucósido 0-2 %
  - Cianidina-3-O- sambudiósido (gospicianina) 0-4 %
  - Cianidina-3-O-glucósido 0-1 %
- 30 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** el extracto purificado de hibisco está asociado a un vehículo farmacéuticamente aceptable.