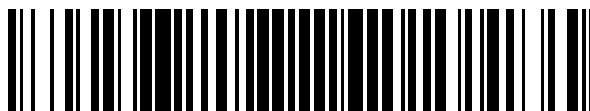


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 489**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 36/889 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2013** **PCT/CU2013/000003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013** **WO13189467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2013** **E 13742149 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017** **EP 2862567**

54 Título: **Compuestos a partir de los frutos de Acrocomia crispera y Acrocomia aculata contra la inflamación y el estrés oxidativo**

30 Prioridad:

19.06.2012 CU 9712

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2018

73 Titular/es:

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CNIC) (100.0%)
Avenida 25, No. 15202, esq. a 158 Cubanacan,
Playa
Ciudad de la Habana 12100, CU**

72 Inventor/es:

**GONZALES CANAVACIOLO, VICTOR LUIS;
SIERRA PÉREZ, ROXANA, DE LA CARIDAD;
MAS FERREIRO, ROSA MARÍA;
PÉREZ GUERRA, YOHANI;
OYARZÁBAL YERA, ÁMBAR;
RODRÍGUEZ LEYES, EDUARDO ANTONIO;
MOLINA CUEVAS, VIVIAN y
GÁMEZ MENÉNDEZ, RAFAEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 648 489 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

Compuestos a partir de los frutos de *Acrocomia crisper* y *Acrocomia aculeata* contra la inflamación y el estrés oxidativo

Sector técnico

5 Esta invención está relacionada con la obtención de un nuevo ingrediente activo que puede ser empleado como suplemento nutricional o como producto farmacéutico o cosmético, con vistas a prevenir y/o tratar los procesos inflamatorios y el estrés oxidativo que acompañan al proceso de envejecimiento y a numerosas patologías, tales como la hiperplasia prostática benigna (HPB), la prostatitis y la osteoartritis, entre otras, así como también está relacionada con el proceso de obtención de dicho ingrediente activo a partir de frutos verdes o maduros de *Acrocomia crisper* o de *Acrocomia aculeata*, ambas de la familia *Arecaceae*. Este ingrediente activo incluye una
10 mezcla de ácidos grasos lineales entre 6 y 28 átomos de carbono, mayoritariamente los saturados: C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0} y C_{18:0}, y los insaturados: C_{16:1}, C_{18:1}, C_{18:2} y C_{18:3}, y pudiendo contener además esteroides y alcoholes grasos de alto peso molecular.

15 El proceso de obtención de este ingrediente activo parte de secar y moler los frutos, y puede incluir una hidrólisis parcial o total (enzimática, básica o ácida) tanto del material vegetal como de su fracción lipídica con recuperación posterior de los ácidos grasos; la extracción selectiva de la fracción lipídica se puede realizar con disolventes orgánicos o mediante una extracción con fluido supercrítico. Ambos procedimientos, con y sin hidrólisis, permiten obtener ingredientes activos con efectos farmacológicos y fisiológicos similares.

20 La presente invención se relaciona con la industria alimenticia y con la farmacéutica, pues el ingrediente activo obtenido puede ser utilizado como tal o en dosis entre 50 y 1.000 mg, como parte de formulaciones nutricionales, cosméticas y/o farmacéuticas para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación y el estrés oxidativo, incluida la HPB, la prostatitis y osteoartritis.

Nivel conocido de la técnica. Características de las soluciones técnicas análogas

25 La inflamación es la respuesta vascular y celular de los tejidos a la infección, irritación o a la presencia de sustancias extrañas. Este es uno de los mecanismos de defensa más importantes del organismo, pero cuando la respuesta se incrementa demasiado puede ser perjudicial y en algunos casos fatal. La inflamación constituye un factor etiológico importante en el desarrollo de enfermedades crónicas como la osteoartritis, la HPB, la prostatitis, las enfermedades inflamatorias del intestino, el cáncer, entre otras. La frecuencia de padecer enfermedades inflamatorias crónicas se incrementa con la edad y con el aumento de la expectativa de vida.

30 Durante la inflamación, las células activadas son capaces de utilizar los lípidos de su membrana celular para generar mediadores lipídicos que actúan como señales intracelulares o extracelulares.

35 El ácido araquidónico (AA), ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono (ácido 5, 8, 11, 14 eicosatetraenoico) obtenido de los alimentos o por conversión del ácido linoleico, se libera de los fosfolípidos de la membrana celular a través de la activación de la fosfolipasa A2, enzima que se activa por estímulos físicos, químicos o biológicos (Aster, 2009). Los metabolitos derivados del AA, denominados eicosanoides, se sintetizan a través de la vía de las enzimas ciclooxigenasas (COX) (COX-1 y COX-2), la cual permite la generación de prostaglandinas, y tromboxanos, y a través de la vía de las lipooxigenasas (LOX), familia de enzimas citosólicas 5-LOX, 15-LOX y 12-LOX, que permiten la generación de leucotrienos y lipoxinas (Díaz, 2001; Gajraj, 2003). Los eicosanoides pueden intervenir en las diferentes fases de la inflamación, se encuentran en el exudado inflamatorio y su síntesis está incrementada en los lugares de la inflamación.

40 La inflamación se clasifica, de acuerdo con la intensidad y duración de la respuesta, en aguda o crónica. La inflamación aguda es de corta duración e involucra tres mecanismos fundamentales: vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y migración leucocitaria (principalmente de neutrófilos) desde la sangre hacia el foco inflamatorio, aunque también incluye la fagocitosis y la regeneración y reparación celular (Gallin et al. 1992). Los signos característicos de la inflamación aguda son: rubor, hinchazón, calor, dolor y pérdida de la función (Parakrama y Clive, 2005; Porth, 2007).

45 Por su parte, la inflamación crónica puede durar semanas o meses y se caracteriza por la infiltración predominante de linfocitos y macrófagos en el sitio de la lesión, aunque también participan eosinófilos, mastocitos, linfocitos y neutrófilos. La proliferación de vasos sanguíneos y la presencia de fibrosis y necrosis tisular también caracterizan esta fase.

50 La inflamación y el estrés oxidativo están estrechamente relacionados, ya que se ha descrito que la peroxidación lipídica (PL) de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) por vía enzimática produce especies radicalarias de origen lipídico, las que se producen en este caso, de manera controlada, por la acción de enzimas implicadas en vías metabólicas celulares. Dentro de este tipo de PL se describe típicamente las acciones de la LOX y la COX, puesto que ambas enzimas catalizan la reacción entre el O₂ y varios AGPI produciendo hidroperóxidos y endoperóxidos lipídicos. En el caso de la LOX se describe que su acción catalítica sobre el AA genera hidroperóxidos lipídicos (HPETE) que pueden a su vez transformarse en productos hidroxilados (HETE).

Por otro lado, aunque los hidroperóxidos orgánicos formados son estructuras bastante estables, pueden descomponerse en presencia de metales de transición (iones cobre y hierro) y generar una compleja mezcla de productos de peroxidación secundarios, tales como gases hidrocarburos (etano y propano) y aldehídos (malondialdehído y 4-hidroxinonenal), que consecuentemente pueden dañar la estructura celular (Halliwell, 1995).

5 En tal sentido y con el objetivo de aliviar la inflamación se ha desarrollado y utilizado durante décadas una amplia gama de agentes antiinflamatorios, tanto de origen sintético como natural. Dentro de los más reconocidos se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los esteroideos (AIE), medicamentos muy efectivos empleados para tratar la inflamación aguda, crónica y el dolor asociado, los cuales representan clases terapéuticas muy prescritas.

10 No obstante, estos agentes producen diversas experiencias adversas (EA), entre las que se destacan las gastrointestinales, renales y/o cardiovasculares, según el tipo de antiinflamatorio (Salles, 2007).

El mecanismo de acción de los AINE se basa en la inhibición de la actividad enzimática de la COX. Los AINE se clasifican en: no selectivos o inespecíficos (inhiben las isoformas 1 y 2 de la COX) y selectivos de la COX-2 (Sciulli et al. 2005). Los AINE no selectivos (ácido acetil salicílico, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, entre otros) son muy efectivos en el control del dolor y de la progresión de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, pero su principal limitación la constituyen las EA que producen sobre el tracto gastrointestinal, llegando a ser severos si se administran por períodos prolongados o en pacientes de edad avanzada. También pueden producir elevación de la presión arterial y nefrotoxicidad (García y Hernández-Díaz, 2004; Lanas y Fernández, 2006).

Los AINE específicos de la COX-2 (celecoxib, etoricoxib) son medicamentos de generación más reciente y su alta selectividad por la isoforma 2 sustenta una mejor tolerabilidad gástrica (Silverstein et al. 2000). Sin embargo, su uso se asocia a la ocurrencia de severas EA cardiovasculares que incluso han conducido a la retirada del mercado del rofecoxib y valdecoxib (Biandizzi et al. 2008).

Los AIE (prednisona, prednisolona, dexametasona, entre otros) producen EA gastrointestinales, hiperglicemia, óseos (osteoporosis y osteonecrosis que conducen a diversas fracturas, síndrome de Cushing, hipertensión arterial, ptequias y equimosis, eritema facial, vértigo y cefaleas) (Mazziotti et al. 2006; Kerachian et al. 2009).

Finalmente, los antiinflamatorios duales (inhibidores de la 5-LOX y la COX) reducen la progresión y desarrollo de los procesos inflamatorios crónicos sin producir la gastrototoxicidad típica de los AINE inespecíficos (Whitehouse y-Butters, 2003; Whitehouse, 2004).

Entre las patologías que involucran la inflamación crónica se encuentra la HPB, ya que se conoce que la infiltración de células inflamatorias en la próstata constituye un factor etiológico importante en su desarrollo (Roehrborn, 2008; Zhu y McGinley, 2009) por lo que sustancias que posean un efecto antiinflamatorio podrían ser útiles en el tratamiento de esta enfermedad.

La HPB se encuentra, junto al cáncer y la prostatitis, entre los procesos patológicos más relevantes que afectan la próstata y disminuyen la calidad de vida de la población masculina adulta, fundamentalmente en hombres mayores de 50 años (Fernández y Pereira, 2008; Alcaraz et al., 2008). La HPB consiste en el crecimiento no maligno e incontrolado de la próstata, glándula que al localizarse a la salida de la vejiga y rodear la primera parte de la uretra, tiende a causar obstrucción cuando crece. En consecuencia, la mayoría de los pacientes con HPB presentan síntomas del tracto bajo urinario (STBU) como retención urinaria, disminución del volumen de orina y de la presión de la micción, latencia aumentada para orinar, irritación, incontinencia vesical y nocturia (Nix y Carson, 2007; Roehrborn, 2008; Zhu y McGinley, 2009).

La etiología de la HPB, multifactorial y no del todo dilucidada, involucra fundamentalmente un factor hormonal consistente en el aumento de la conversión de testosterona en dihidrotestosterona (DHT) por acción de la 5 α -reductasa prostática que desencadena la proliferación celular y el agrandamiento de la próstata (componente estático de la HPB), y por un componente no hormonal consistente en el aumento del tono del músculo liso de la vejiga y la próstata (componente dinámico) regulado por los adrenoreceptores (ADR)- α 1 (Nix y Carson, 2007; Zhu y McGinley, 2009). Mientras el componente hormonal desempeña un papel crucial en el desarrollo de la hiperplasia y en el aumento del tamaño de la próstata, el aumento del tono de la musculatura lisa urogenital es fundamental en el desarrollo de los STBU (Roehrborn, 2008).

El tratamiento de la HPB incluye, según el grado de avance de la enfermedad, desde la vigilancia atenta hasta la cirugía, si bien el más utilizado es el farmacológico, el cual se basa fundamentalmente en emplear inhibidores de la 5 α -reductasa prostática y antagonistas de los ADR- α 1 (Doggrell, 2004; Roehrborn et al., 2008; Schwinn y Roehrborn, 2008).

Sin embargo, el tratamiento con los primeros (finasteride, dutasteride), aunque previene la progresión de la HPB y reduce moderadamente el volumen prostático, no siempre mejora los síntomas y puede provocar EA como disminución de la libido, impotencia y trastornos de la eyaculación (Sandhu y Te, 2004; González y Vegas, 2007; Roehrborn, 2008; Roehrborn et al., 2008). Por su parte, los antagonistas de los ADR- α 1 (Aifuzosin, doxazosin, prazosin, terazosin, tamsulosin) suelen aliviar rápidamente los síntomas, pero no afectan el tamaño prostático y

pueden provocar EA como hipotensión ortostática, fatiga, mareos, disfunción eyaculatoria y alteraciones del músculo iridiano (Lepor, 2006; Van Dijk et al., 2006; Bar-Yosef et al., 2008; Prata et al., 2009).

Además, la inflamación crónica y el aumento del estrés oxidativo se vinculan a la etiopatogenia de la HPB, ya que evidencias crecientes demuestran la importancia de la inflamación crónica en la etiología y progresión de la HPB, por lo cual recientemente se incorpora el uso de sustancias antiinflamatorias al manejo de esta patología. Por otra parte, varias evidencias sugieren una relación causal entre el estrés oxidativo celular en el tejido prostático y el desarrollo de la HPB, y que sustancias que reducen la hiperplasia prostática (HP) y producen efectos antioxidantes, presentan un beneficio adicional sobre la próstata hipertrofiada (Aydin et al., 2006; Aryal et al., 2007; Siddiqui et al., 2006; Belostotskaia et al., 2006; Prasad et al., 2006).

Entre los tratamientos farmacológicos de la entidad HPB/STBU se destaca, sin embargo, como una alternativa con menores EA, la fitoterapia con extractos de frutos de *Serenoa repens*, semillas de *Cucurbita pepo*, resina del árbol *Prunus africana* y raíces de *Urtica dioica* (Wilt et al., 2000; Koch, 2001; Curtis, 2008). De estos, el extracto lipídico de los frutos de *S. repens* (ELSr), consistente en una mezcla de ácidos grasos libres y esterificados, esteroides y alcoholes grasos, es el más utilizado (Lowe, 2001; Gordon y Shaughnessy, 2003; Rockville, 2005; Curtis, 2008).

El mecanismo de acción del ELSr es multifactorial e involucra varios de los factores referidos, tales como la inhibición de la 5 α -reductasa (Raynaud et al., 2000; Abe et al., 2009), el antagonismo de los ADR- α 1 (Gerber et al., 2001; Debruyne et al., 2002; Abe et al., 2009), la actividad anti-inflamatoria por inhibición de las enzimas COX y 5-lipooxigenasa (5-LOX) (Mogul et al., 2000; Potenziani, 2003; Raman et al., 2007; Curtis, 2008) y efectos antioxidantes (Henry, 2000; Perona, 2005; Chapkin et al., 2007), entre otros. Aunque sus datos de toxicología preclínica son escasos, el ELSr es bien tolerado, y presenta una baja frecuencia de EA (Rockville, 2005).

Otro extracto lipídico con potencialidades en el tratamiento de la HPB, el D-004, ha sido recientemente desarrollado a partir de frutos de *Roystonea regia*. El mecanismo de acción que sustenta su eficacia en modelos de HP es multifactorial, e involucra la inhibición competitiva de la 5 α -reductasa prostática, y el antagonismo no competitivo de la respuesta contráctil del tejido prostático mediada por los ADR- α 1. Además, el D-004 produce efectos pleiotrópicos antiinflamatorios (asociados a la inhibición de la 5-LOX) y antioxidantes (tanto en tejido prostático normal como en el hipertrofiado), lo cual potencialmente podría contribuir a su eficacia (Menéndez, 2006; Pérez, 2008).

Otra de las patologías que se encuentran presentes en procesos inflamatorios es la osteoartritis (OA), la más común de las artritis degenerativas, que se caracteriza por un desorden del equilibrio normal entre la síntesis y degradación de la matriz cartilaginosa (constituida por proteoglicanos, colágeno y agua), destrucción del cartílago, alteración del hueso subcondral y posterior reacción inflamatoria, en la cual el cartílago no solo no se regenera posteriormente, sino que puede llegar a desaparecer (Little, 2008).

En el pasado las investigaciones sobre OA se centraban fundamentalmente en la degeneración del cartílago por considerarse el cambio subyacente más importante, pero actualmente se acepta que la OA involucra todos los componentes de la articulación, no solo el cartílago, ya que estructuras como el hueso subcondral, ligamentos, cápsula articular, membrana sinovial, músculos periarticulares, meniscos y terminaciones nerviosas sensoriales participan en el proceso inflamatorio (Lotz, 2010; Heinegard, 2011). La respuesta del hueso subcondral en la OA incluye la producción de "hueso nuevo" que da lugar al desarrollo de osteofitos marginales que se proyectan al exterior como nódulos que pueden inflamarse secundariamente o bien como crecimientos óseos capaces de irritar estructuras vecinas (Buckland-Wright, 2004; Little, 2008).

Los medicamentos más utilizados para tratar la OA son los que mejoran el dolor y la incapacidad funcional como los AINE y AIE, pero que no modifican el curso de la enfermedad, ya que no evitan el daño del cartílago (McMahon, 2008). Los AINE producen diversas EA. Los antiesortivos también se han utilizado en el manejo de la OA, habiéndose demostrado que el alendronato y los estrógenos reducen significativamente las lesiones de hueso subcondral en ancianas con OA de rodilla con respecto a las ancianas no tratadas (Carbone, 2004), apoyando el concepto de que la OA involucra todo órgano articular (cartílago y hueso).

El aumento del estrés oxidativo, desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales (RL) generados en el metabolismo celular y la capacidad de los sistemas antioxidantes para contrarrestar su producción y/o efectos, se considera un factor que contribuye a la etiopatogenia de la OA, en la cual se produce un aumento de la PL y una reducción de defensas antioxidantes endógenas como la vitamina C y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) (Manesh, 2005; Chandran, 2009).

Sin embargo, hasta el presente no se había reportado la obtención de ingredientes activos a partir de frutos de las especies *Acrocomia crispata* (*A. crispata*) y/o *Acrocomia aculeata* (*A. aculeata*), con efectos antioxidantes y efectivos en la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios, incluidos los anteriormente referidos, ni tampoco un método tan sencillo y económico para la obtención de este tipo de sustancia.

El ingrediente activo reivindicado en la presente invención supera además en eficacia y potencia a los extractos de origen natural anteriormente mencionados sin presentar los efectos adversos reportados para las drogas sintéticas.

Exposición de la invención

El procedimiento de obtención del ingrediente activo objeto de la presente invención se basa en el empleo de los frutos verdes o maduros de las especies *A. crispa* y/o *A. aculeata*, ambas de la familia *Arecaceae*. Dichos frutos son secados en condiciones ambientales o en estufas y molidos en un molino de cuchillas, martillo o laminador hasta obtener un tamaño de partícula < 3 mm, y a partir de este material seco y molido se obtiene un ingrediente activo de naturaleza lipídica compuesto mayoritariamente por ácidos grasos libres, aunque también puede contener en menores proporciones esteroides y alcoholes alifáticos de alto peso molecular. En la obtención de dicho ingrediente activo se puede aplicar una hidrólisis (total o parcial) enzimática, básica o ácida, con una posterior recuperación de los ácidos grasos, o bien obtener el ingrediente activo mediante una extracción selectiva con disolventes orgánicos (hidrocarburos, alcoholes, acetato de etilo, acetona o mezclas de estos) o mediante una extracción con fluido supercrítico. La hidrólisis puede ser aplicada directamente al material vegetal molido o al ingrediente activo lipídico obtenido a partir de él.

Para obtener el ingrediente activo con los ácidos grasos mayoritariamente en forma de acilglicéridos o ésteres etílicos el material vegetal seco y molido se somete a una extracción selectiva con disolventes orgánicos, con posterior filtrado y eliminación de los disolventes con calor a presión reducida, o a una extracción en condiciones supercríticas. En el proceso de extracción se puede emplear un extractor sólido líquido convencional, como un reactor con agitación o un extractor del tipo soxhlet, donde los ácidos grasos (en forma de acilglicéridos, ésteres etílicos y en menor proporción libres) se separan de los componentes que les acompañan en el material vegetal al disolverse selectivamente en un disolvente adecuado, buscado entre alcoholes de 1 a 3 átomos de carbono (metanol, etanol, 2-propanol) e hidrocarburos de 5 a 8 átomos de carbono (pentano, isopentano, hexano, heptano y octano), acetato de etilo, acetona o mezclas de estos, y también pueden obtenerse por extracción supercrítica con CO₂. La extracción con etanol propicia la obtención de ésteres etílicos, presentes en pequeña proporción en la planta, lo cual se favorece en un medio ácido.

Para obtener el ingrediente activo con los ácidos grasos en forma libre se aplica una hidrólisis enzimática (con lipasa) básica (con hidróxidos alcalinos o alcalino térreos, orgánicos, o hidróxido de amonio) o ácida (con ácido clorhídrico, cítrico o sulfúrico). Dicha hidrólisis, que puede ser total o parcial, se puede aplicar al material vegetal molido o al extracto lipídico obtenido a partir de él y posteriormente se recuperan los ácidos grasos libres. Al ser aplicada la hidrólisis básica, los ácidos grasos son liberados en un medio ácido con agitación (empleando ácido clorhídrico, cítrico o sulfúrico diluido) y se separan de la fase acuosa formando una fase oleosa superior, la cual es lavada con agua tratada y secada con calor a presión reducida.

Por este método se logra entre un 10 y un 40 % de rendimiento a partir del material vegetal seco y molido, resultando la obtención de este ingrediente activo, el cual se compone mayoritariamente por ácidos lineales libres o esterificados como acilglicéridos o etílicos, principalmente los ácidos saturados de 8, 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono, así como por los insaturados de 16 y 18 átomos de carbono, pudiendo también contener esteroides y alcoholes grasos. La proporción de ácidos grasos (libres o esterificados) en esta mezcla se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos en el ingrediente activo

Componente	Contenido relativo (%)
Ácido caprílico (C _{8:0})	< 3,0
Ácido cáprico (C _{10:0})	< 3,0
Ácido láurico (C _{12:0})	30,0-40,0
Ácido mirístico (C _{14:0})	8,0-15,0
Ácido palmítico (C _{16:0})	5,0-12,0
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	< 3,0
Ácido esteárico (C _{18:0})	1,0-5,0
Ácido oleico (C _{18:1})*	20,0-35,0*
* Se determina y se reporta como ácido oleico a la mezcla del propio ácido oleico C _{18:1} (60-70 % del total); el linoleico C _{18:2} (25-40 % del total) y el linolénico C _{18:3} (<10 % del total).	

Una valoración global permite afirmar que esta sustancia o ingrediente activo es más eficaz y potente que los ingredientes activos de origen vegetal conocidos hasta el presente para la prevención y/o tratamiento de procesos inflamatorios y estrés oxidativo, incluidos la HPB, la prostatitis y la osteoartritis. Este ingrediente activo ha

demostrado ausencia de toxicidad en estudios con roedores y ha resultado muy bien tolerado en humanos, lo cual representa una ventaja de su uso potencial.

Ejemplos de realización

Los objetivos de la presente invención se describirán en detalle a continuación mediante ejemplos que no limitan al alcance de la misma.

Ejemplo 1

Se toman 5 kg de frutos frescos de *A. crisper*, se ponen a secar en estufa con temperatura controlada a 60 °C durante 7 días y posteriormente se muelen en molino de cuchillas hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 1.500 y 2.000 µm. De este polvo se toman 1.000 g y se sitúan en un reactor agitado, se someten a extracción con 10 l de hexano con calentamiento a 55 °C y agitación constante durante 16 horas, este proceso se repite tres veces. Al cabo de este tiempo se filtra y se evapora a sequedad a 50 °C empleando vacío. La sustancia obtenida pesa 120 g y presenta la composición mostrada en la Tabla 2, la cual se determina por cromatografía de gases. Al aplicar igual procedimiento a frutos de *A. aculeata* se obtuvieron 150 g de ingrediente activo.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (%) en el ingrediente activo

Componente	Ingrediente activo obtenido de <i>A. crisper</i> (%)	Ingrediente activo obtenido de <i>A. aculeata</i> (%)
Ácido caprílico (C _{8:0})	1,6	1,3
Ácido cáprico (C _{10:0})	0,9	0,7
Ácido láurico (C _{12:0})	32,2	31,8
Ácido mirístico (C _{14:0})	14,7	14,5
Ácido palmítico (C _{16:0})	11,5	11,7
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	0,5	0,8
Ácido esteárico (C _{18:0})	4,4	4,6
Ácido oleico (C _{18:1})*	34,2	34,6
* Se determina y se reporta como ácido oleico a la mezcla del ácido oleico C _{18:1} , el linoleico C _{18:2} y el linolénico C _{18:3} .		

Ejemplo 2

Se toman 10 kg. de frutos frescos de *A. aculeata*, se ponen a secar en condiciones ambientales durante 15 días y posteriormente se muelen empleando un molino de martillos hasta obtener un tamaño de partícula < 1.500 µm. De este polvo se toman 1.000 g, se someten a hidrólisis alcalina, se liberan los ácidos con HCl al 30 %, se extrae la fase orgánica, se lava 5 veces con agua, se filtra y se evapora a sequedad a 80 °C con la ayuda de vacío. La sustancia así obtenida se pesa (200 g) y se analiza por cromatografía de gases, resultando la composición que se presenta en la Tabla 3. Al aplicar igual procedimiento a frutos de *A. crisper* se obtuvieron 230 g de ingrediente activo.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (%) en el ingrediente activo

Componente	Ingrediente activo obtenido de <i>A. crisper</i> (%)	Ingrediente activo obtenido de <i>A. aculeata</i> (%)
Ácido caprílico (C _{8:0})	1,2	0,9
Ácido cáprico (C _{10:0})	1,9	1,7
Ácido láurico (C _{12:0})	37,8	39,0
Ácido mirístico (C _{14:0})	14,3	14,9
Ácido palmítico (C _{16:0})	10,9	11,3
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	0,2	1,4

(continuación)

Componente	Ingrediente activo obtenido de <i>A. crispata</i> (%)	Ingrediente activo obtenido de <i>A. aculeata</i> (%)
Ácido esteárico (C _{18:0})	3,3	3,6
Ácido oleico (C _{18:1})*	30,4	27,2
* Se determina y se reporta como ácido oleico a la mezcla del ácido oleico C _{18:1} , el linoleico C _{18:2} y el linolénico C _{18:3} .		

Ejemplo 3

Se toman 5 kg. de frutos frescos de *A. crispata* y 5 kg de frutos frescos de *A. aculeata* y, se ponen a secar en estufa con temperatura controlada a 45 °C durante 7 días y posteriormente se muelen empleando un molino hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 1.500 y 1.800 µm. De este polvo se toman 1.000 g, se someten a extracción supercrítica continua con 10 l de CO₂ por 2 h a 35 °C y 250 bar. Posteriormente el extracto obtenido se somete a hidrólisis enzimática, se pesa (150 g) y se analiza por cromatografía de gases, presentando la composición que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (%) en el ingrediente activo

Componente	Ingrediente activo obtenido de <i>A. crispata</i> (%)	Ingrediente activo obtenido de <i>A. aculeata</i> (%)
Ácido caprílico (C _{8:0})	2,0	1,5
Ácido cáprico (C _{10:0})	1,5	2,2
Ácido láurico (C _{12:0})	32,5	32,7
Ácido mirístico (C _{14:0})	13,8	14,1
Ácido palmítico (C _{16:0})	11,9	11,6
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	1,3	1,8
Ácido esteárico (C _{18:0})	2,6	1,9
Ácido oleico (C _{18:1})*	34,4	34,2
* Se determina y se reporta como ácido oleico a la mezcla del ácido oleico C _{18:1} , el linoleico C _{18:2} y el linolénico C _{18:3} .		

Ejemplo 4

Se tomaron 10 kg de frutos frescos de *A. crispata*, se pusieron a secar en condiciones ambientales durante 20 días y posteriormente se molieron empleando un molino laminador hasta obtener un tamaño de partícula < 1.000 µm. De este polvo se tomaron 1.000 g, los que se trataron en soxhlet con 10 l de etanol a 65 °C con agitación constante durante 36 horas. Al cabo de este tiempo se filtró y se evaporó a sequedad a 80 °C empleando vacío. Luego de eliminado el disolvente se hidrolizó parcialmente con una disolución de hidróxido de amonio a 60 °C. Liberados los ácidos grasos con ácido sulfúrico al 10 % el extracto así obtenido se lavó con agua y se secó al vacío, se pesó (300 g) y se analizó por cromatografía de gases, la composición obtenida se presenta en la Tabla 5. Al aplicar igual procedimiento a frutos de *A. aculeata* se obtuvieron 280 g de ingrediente activo.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (%) en el ingrediente activo

Componente	Ingrediente activo obtenido de <i>A. crispata</i> (%)	Ingrediente activo obtenido de <i>A. aculeata</i> (%)
Ácido caprílico (C _{8:0})	0,9	0,7
Ácido cáprico (C _{10:0})	1,5	1,8
Ácido láurico (C _{12:0})	39,8	39,9

(continuación)

Componente	Ingrediente activo obtenido de <i>A. crisper</i> (%)	Ingrediente activo obtenido de <i>A. aculeata</i> (%)
Ácido mirístico (C _{14:0})	14,3	14,1
Ácido palmítico (C _{16:0})	7,4	8,6
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	1,2	0,9
Ácido esteárico (C _{18:0})	1,1	1,3
Ácido oleico (C _{18:1})*	33,8	31,7
* Se determina y se reporta como ácido oleico a la mezcla del ácido oleico C _{18:1} , el linoleico C _{18:2} y el linolénico C _{18:3} .		

Ejemplo 5

- 5 Se tomaron 10 kg de frutos frescos de *A. crisper*, se pusieron a secar en condiciones ambientales durante 20 días y posteriormente se molieron empleando un molino laminador hasta obtener un tamaño de partícula < 1.000 m. De este polvo se tomaron 1.000 g, los que se trataron en un reactor agitado con 10 l de etanol a 65 °C con agitación constante durante 36 horas. Al cabo de este tiempo se filtró y se evaporó a sequedad a 80 °C empleando vacío. Luego de eliminado el disolvente se hidrolizó con una disolución de ácido clorhídrico a 60 °C. El extracto así
- 10 obtenido se lavó con agua y se secó al vacío, se pesó (250 g) y se analizó por cromatografía de gases, la composición obtenida se presenta en la Tabla 6. Al aplicar igual procedimiento a frutos de *A. aculeata* se obtuvieron 220 g de ingrediente activo.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos (%) en el ingrediente activo

Componente	Ingrediente activo obtenido de <i>A. crisper</i> (%)	Ingrediente activo obtenido de <i>A. aculeata</i> (%)
Ácido caprílico (C _{8:0})	1,1	0,8
Ácido cáprico (C _{10:0})	1,3	1,3
Ácido láurico (C _{12:0})	39,0	39,3
Ácido mirístico (C _{14:0})	14,6	14,0
Ácido palmítico (C _{16:0})	7,1	8,1
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	1,1	1,8
Ácido esteárico (C _{18:0})	1,2	1,1
Ácido oleico (C _{18:1})*	34,6	33,6
* Se determina y se reporta como ácido oleico a la mezcla del ácido oleico C _{18:1} , el linoleico C _{18:2} y el linolénico C _{18:3} .		

Ejemplo 6

- 15 El efecto de los ingredientes activos referidos en el ejemplo 1 se evaluó en un modelo de inflamación crónica (granuloma por algodón) para lo cual utilizaron ratas Sprague Dawley machos (250-270 g) adaptadas durante 7 días a las condiciones de laboratorio. Después del período de adaptación las ratas se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos y se anestesiaron con tiopental sódico (30 mg/kg, i.p). Se les desinfectó la zona de la espalda con alcohol al 70 % y se les realizó una incisión en la mitad dorso lateral, creando un túnel subcutáneo mediante pinzas
- 20 romas, donde se colocó una mota de algodón estéril de 50 mg. La herida se suturó y se aplicó un antiséptico local. Transcurridas 18 horas de la última administración, las ratas se sacrificaron en atmósfera de éter, los granulomas se disecaron cuidadosamente y se colocaron en una estufa a 60 °C durante 24 horas, hasta alcanzar un peso constante. Para calcular el peso seco de los granulomas, el peso de la mota de algodón (50 mg) se sustrajo de este valor. El grado (%) de inhibición se expresó tomando como 100 % de inflamación el peso del granuloma del grupo
- 25 control.

Los extractos de los frutos de *A. crispa* y *A. aculeata*, fueron emulsionados en una disolución Tween-20/H₂O. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 7 grupos (10 ratas/grupo): un control tratado con el vehículo, 3 grupos tratados con extractos de *A. crispa* y 3 con extractos de *A. aculeata* (25, 200 y 500 mg/kg) respectivamente. La administración se realizó mediante entubación gástrica (5ml/kg) durante los 6 días siguientes a la implantación de la mota de algodón. Posteriormente, se cuantificó el peso seco del granuloma. La comparación entre los grupos controles y tratados se realizó con el test de la U de Mann Whitney.

La implantación subcutánea de una mota de algodón en la mitad dorso lateral de los animales produjo la formación de un granuloma (Tabla 7). Todos los tratamientos redujeron significativamente el peso seco del granuloma en relación al de los controles. El efecto de los extractos de los frutos de *A. crispa* y *A. aculeata* aumentó con las dosis hasta un 54,6 y 55,4 % de inhibición, respectivamente, con la dosis de 500 mg/kg. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la eficacia de los extractos de los frutos de *A. crispa* y *A. aculeata* en el modelo del granuloma por algodón en ratas observándose una disminución significativa del peso seco del granuloma, mostrando su potencial terapéutico como antiinflamatorio.

Tabla 7. Efecto de los extractos de *A. crispa* y *A. aculeata* en el modelo de granuloma por algodón en ratas

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Peso seco del granuloma (mg)	I (%)
Control (vehículo + granuloma)	0	258,0 ± 0,12	-
<i>Acrocomia crispa</i> + granuloma	25	138,0 ± 0,05*	46,5
<i>Acrocomia crispa</i> + granuloma	200	132,0 ± 0,11*	48,8
<i>Acrocomia crispa</i> + granuloma	500	117,0 ± 0,04**	54,6
<i>Acrocomia aculeata</i> + granuloma	25	135,0 ± 0,05*	47,6
<i>Acrocomia aculeata</i> + granuloma	200	130,0 ± 0,11*	49,6
<i>Acrocomia aculeata</i> + granuloma	500	115,0 ± 0,04**	55,4
Valores expresados como Media ± EEM (error estándar de la media); I (%): porcentaje de inhibición * p < 0,05; ** p < 0,01 Comparación vs Control, (Test de la U de Mann Whitney)			

Ejemplo 7

El efecto de los ingredientes activos citados en el ejemplo 2 se evaluó en un modelo de inflamación aguda (pleuresía por carragenina dosis única en ratas). Se emplearon ratas Sprague Dawley machos (190-290 g de peso) las cuales se adaptaron durante 7 días a las condiciones de laboratorio. Después del período de adaptación los animales se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos.

Posteriormente, las ratas se anestesiaron en atmósfera de éter, se les realizó una incisión en el dorso lateral y se le inyectó 0,3 ml de la disolución de carragenina al 1 % en disolución salina en la cavidad pleural. Cinco horas después de la inducción de la inflamación las ratas se sacrificaron para la obtención del exudado pleural, para lo cual se anestesiaron en atmósfera de éter y se desangraron por la aorta abdominal. Para obtener el exudado pleural la cavidad pleural se abrió y se le añadió 1 ml de citrato de sodio al 3,15 % que se homogenizó con el exudado, el cual se extrajo cuidadosamente utilizando una pipeta automática. Una vez colectado se trasvasó a un tubo plástico graduado para determinar el volumen de exudado (VE). Posteriormente, se determinó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en el exudado.

Para su administración, los extractos de los frutos de *A. crispa* y *A. aculeata*, fueron emulsionados en una disolución Tween-20/H₂O, administrándose como dosis únicas mediante entubación gástrica (5ml/kg). Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos (10 ratas/grupo): un control negativo al cual se le inyectó disolución salina en la cavidad pleural y 7 grupos a los cuales se les indujo la pleuresía mediante la inyección de carragenina: un control positivo tratado con vehículo, 3 grupos tratados con extractos de *A. crispa* y 3 con extractos de *A. aculeata* (25, 200 y 500 mg/kg) respectivamente. La comparación entre los grupos controles y tratados fue realizada mediante el test de la U de Mann Whitney.

La inyección de carragenina produjo un aumento significativo del VE y de la actividad enzimática de la MPO del exudado con respecto al grupo control negativo (Tabla 8).

La administración del objeto de la presente invención (25, 200, 500 mg/kg) por vía oral (dosis única) resultó efectivo en reducir el VE e inhibir la actividad enzimática de la MPO de modo significativo y dependiente de la dosis, de modo que la mayor dosis ensayada (500 mg/kg) redujo el VE en más de un 50 % respecto al control positivo, e inhibió la actividad de la MPO.

- 5 Los resultados obtenidos demuestran la eficacia de los extractos de los frutos de *A. crispa* y *A. aculeata* en el modelo de pleuresía por carragenina en ratas observándose una reducción dosis-dependiente del VE y la actividad de la MPO, mostrando su potencial como antiinflamatorio.

Tabla 8. Efecto del tratamiento oral con los extractos de los frutos de *A. crispa* y *A. aculeata* sobre la formación de edema y aumento de la actividad de la MPO en el modelo de pleuresía por carragenina en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	VE (ml)	I (%)	MPO (U/mg de proteína)	I (%)
Control negativo (vehículo)	0	0,01 ± 0,01***	-	0,37 ± 0,16***	-
Control positivo (vehículo + C)	0	1,45 ± 0,03	-	43,58 ± 1,84	-
<i>Acrocomia crispa</i> + C	25	1,12 ± 0,06**	22,9	36,70 ± 1,25*	15,9
<i>Acrocomia crispa</i> + C	200	0,95 ± 0,06***	34,7	29,93 ± 0,97***	31,6
<i>Acrocomia crispa</i> + C	500	0,73 ± 0,05***	50,0	21,82 ± 1,11***	50,0
<i>Acrocomia aculeata</i> + C	25	1,11 ± 0,06**	23,6	35,35 ± 1,27*	19,0
<i>Acrocomia aculeata</i> + C	200	0,94 ± 0,05***	35,4	29,99 ± 0,97***	31,4
<i>Acrocomia aculeata</i> + C	500	0,73 ± 0,05***	50,0	21,85 ± 1,15***	50,0

Valores expresados como Media ± EEM (error estándar de la media); VE: volumen de exudado; MPO: mieloperoxidasa; I (%): porcentaje de inhibición; C: carragenina.
 *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Comparación vs grupo control (+); Test de la U de Mann Whitney

Ejemplo 8

Estudio comparativo de los efectos de los ingredientes activos referidos en el ejemplo 3 con los de extractos lipídicos de los frutos de *S. repens* (ELSr) y *R. regia* (D004) sobre un modelo de inflamación aguda (edema en la oreja de ratón por xileno).

Para realizar este estudio se emplearon ratones machos adultos jóvenes OF-1 (20-30 g) adaptados durante 7 días a las condiciones de laboratorio. Después del período de adaptación los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos: un control negativo + vehículo, un control positivo (tratado con el vehículo + aplicación del Xileno); y 4 tratados con los extractos de *A. crispa*, *A. aculeata*, ELSr y D-004, a los que se le aplicó el xileno, todos administrados a dosis de 400 mg/kg. Todos los tratamientos se administraron 1 hora antes de la inducción del edema.

La inducción del edema se realizó, aplicando tópicamente 30 µl de xileno puro en la superficie dorsal de la oreja derecha del ratón. Dos horas más tarde se cuantificó el edema, para lo cual los ratones se anestesiaron en atmósfera de éter y se sacrificaron por dislocación cervical. Ambas orejas se cortaron y se pesaron en una balanza analítica (Mettler Toledo). La formación de edema se calculó mediante la diferencia de peso (mg) entre la oreja derecha (con edema) y la oreja izquierda (sin edema) (ΔO). La comparación entre los grupos controles y tratados fue realizada mediante el test de la U de Mann Whitney.

La aplicación tópica de xileno aumentó significativamente la diferencia de peso entre ambas orejas, indicativo de formación de edema comparado con el grupo de control negativo (tabla 9). Todos los tratamientos inhibieron significativamente el aumento del edema. Los extractos de *A. crispa* (54,5 % de reducción) y *A. aculeata* (52,9 % de reducción) resultaron más efectivos que el ELSr (26,7 % de reducción) y el D-004 (34,0 % de reducción).

Estos resultados indican que la eficacia del tratamiento oral con extractos de los frutos de *A. crispa* y *A. aculeata* (400 mg/kg) tras la inducción del edema por xileno en la oreja de ratón fue mayor que la de similares dosis de ELSr y D-004.

Tabla 9. Efecto de los extractos de los frutos de *Acrocomia crispera*, *Acrocomia aculeata*, ELSr y D004 sobre el edema inducido por xileno en oreja de ratón.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Edema (ΔO)	I (%)
Control negativo	0	2,67 $\pm$ 1,08***	-
Control positivo + xileno	0	37,87 $\pm$ 5,34	-
<i>Acrocomia crispera</i> + xileno	400	18,67 $\pm$ 3,25**	54,5
<i>Acrocomia aculeata</i> + xileno	400	19,25 $\pm$ 3,71**	52,9
ELSr + xileno	400	28,48 $\pm$ 2,74*+ †	26,7
D004 + xileno	400	25,89 $\pm$ 2,36*+ †	34,0

Valores expresados como Media $\pm$ EEM (error estándar de la media);
 % I: porcentaje de inhibición.
 * p < 0,05, **p < 0,01 comparación vs control (+),
 + p < 0,05 comparación vs *Acrocomia crispera*; † p < 0,05 comparación vs *Acrocomia aculeata*, Test de la U de Mann Whitney

Ejemplo 9

- 5 Para evaluar el efecto antioxidante de los ingredientes activos referidos en el ejemplo 4 se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (200-250 g de peso) adaptadas durante 7 días a las condiciones de laboratorio. Después de culminar su período de adaptación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos, se anestesiaron en atmósfera de éter y se desangraron por la aorta abdominal.

- 10 La sangre se colectó con EDTA (10 %) (concentración final: 1mg/ml de sangre). El plasma se obtuvo por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min y se utilizó para determinar las concentraciones de malondialdehído (MDA) (producto de la PL) y grupos sulfidrilos (SH) (producto de la oxidación de proteínas).

- 15 Los extractos de los frutos de *A. crispera* y *A. aculeata*, fueron emulsionados en una disolución Tween-20/H₂O. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 9 grupos (10 ratas/grupo): un control tratado con vehículo, 4 con extractos de *A. crispera* y 4 con extractos de *A. aculeata* (5, 25, 50 y 200 mg/kg), respectivamente. Los tratamientos se administraron mediante entubación gástrica durante 30 días. Posteriormente, se cuantificó las concentraciones plasmáticas de MDA y SH. La comparación entre los grupos controles y tratados fue realizada mediante el test de la U de Mann Whitney.

- 20 Como se observa en la tabla 10, ambos extractos redujeron las cifras plasmáticas de MDA y SH de modo marcado y significativo. Con *A. crispera* se lograron reducciones de un 64,2 % (MDA) y un 58,7 % (grupos SH), y con *A. aculeata* de un 63,4 % (MDA) y un 59,4 % (SH). Estos resultados demuestran la eficacia de los extractos de los frutos de *A. crispera* y *A. aculeata* en reducir los niveles plasmáticos de marcadores de la PL (MDA) y de la oxidación proteica (SH) demostrando que ambos extractos tienen efectos antioxidantes.

Tabla 10. Efecto del tratamiento oral con los extractos de *A. crispera* y *A. aculeata* sobre las cifras plasmáticas de MDA y grupos SH en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	MDA (nmol de MDA/mg de proteína)	I (%)	SHG (mmol)	L (%)
Control		100,75 $\pm$ 3,13	-	1,48 $\pm$ 0,10	-
<i>Acrocomia crispera</i>	5	81,57 $\pm$ 3,48*	19,0	1,27 $\pm$ 0,14	14,1
<i>Acrocomia crispera</i>	25	71,33 $\pm$ 3,51*	29,2	0,88 $\pm$ 0,04*	40,5
<i>Acrocomia crispera</i>	50	38,57 $\pm$ 7,66**	61,7	0,72 $\pm$ 0,04**	51,3
<i>Acrocomia crispera</i>	200	36,01 $\pm$ 5,22**	64,2	0,61 $\pm$ 0,05**	58,7
<i>Acrocomia aculeata</i>	5	82,57 $\pm$ 3,48*	18,0	1,25 $\pm$ 0,11	15,5
<i>Acrocomia aculeata</i>	25	70,14 $\pm$ 3,08*	30,3	0,86 $\pm$ 0,03*	41,8
<i>Acrocomia aculeata</i>	50	37,71 $\pm$ 7,31**	62,5	0,70 $\pm$ 0,07**	52,7
<i>Acrocomia aculeata</i>	200	36,8 $\pm$ 5,33**	63,4	0,60 $\pm$ 0,06**	59,4

Valores expresados como Media $\pm$ EEM (error estándar de la media);
 I (%): porcentaje de inhibición.
 *p < 0,05, **p < 0,01 Comparación vs grupo control, Test de la U de Mann Whitney

Ejemplo 10

Para evaluar el efecto de los ingredientes activos descritos en el ejemplo 5 fueron emulsionados en un vehículo Tween-20/H₂O y se investigaron sus efectos sobre un modelo de HP en ratas. Para ello se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (300-360 g) adaptadas durante 7 días a las condiciones de laboratorio, las cuales se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos experimentales: un control negativo + (vehículo) y 7 grupos a los cuales se les indujo la HP con inyección de testosterona (4 mg/kg), un control positivo, que solo recibió el vehículo, y otros 6 tratados: 3 de ellos con el extracto de los frutos de *A. crisper* y 3 con el de *A. aculeata* (50, 200 y 400 mg/kg). El propionato de testosterona se disolvió en aceite vegetal y se inyectó diariamente, por vía s.c. durante 14 días.

Los tratamientos orales se administraron mediante entubación gástrica (5 ml/kg), una vez al día, durante 14 días. Posteriormente, las ratas se sacrificaron bajo anestesia, se desangraron, el abrió su abdomen mediante una incisión en la línea media ventral, se separaron sus próstatas de las vejigas, se extrajeron y se pesaron. La comparación entre los grupos controles y tratados se realizó con el test de la U de Mann Whitney.

La inyección de testosterona produjo un aumento significativo del peso de la próstata y de la relación peso próstata/peso corporal comparado con el grupo control negativo (Tabla 11). La administración de los extractos de los frutos de *A. crisper* y *A. aculeata* por vía oral durante 14 días redujo significativamente el aumento del tamaño de la próstata inducida por la inyección de testosterona ($\approx 44\%$ con la mayor dosis ensayada).

Estos resultados obtenidos indican la eficacia de los extractos de frutos de *A. crisper* y *A. aculeata* en reducir significativa y marcadamente el aumento del tamaño de la próstata inducido con testosterona en roedores, lo que habla de las potencialidades terapéuticas de estos extractos.

Tabla 11. Efecto de los extractos de *A. crisper* y *A. aculeata* la HP inducida con testosterona en ratas.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	PC	pp	I (%)	PP/PC	I (%)
Control negativo	0	359,7 $\pm$ 6,9	576,03 $\pm$ 51,4***	-	1,60 $\pm$ 0,15***	-
Control positivo	0	338,5 $\pm$ 6,5	916,07 $\pm$ 34,4	-	2,70 $\pm$ 0,12	-
<i>Acrocomia crisper</i> + T	50	338,5 $\pm$ 10,2	895,4 $\pm$ 34,6	6,0	2,64 $\pm$ 0,11	5,45
<i>Acrocomia crisper</i> + T	200	335,3 $\pm$ 6,4	838,05 $\pm$ 30,9*	23,0	2,50 $\pm$ 0,09	18,1
<i>Acrocomia crisper</i> + T	400	349,0 $\pm$ 6,4	775,02 $\pm$ 31,1**	41,4	2,22 $\pm$ 0,06**	43,6
<i>Acrocomia aculeata</i> + T	50	342,8 $\pm$ 10,2	890,8 $\pm$ 35,1	7,4	2,60 $\pm$ 0,12	9,0
<i>Acrocomia aculeata</i> + T	200	332,1 $\pm$ 6,4	840,03 $\pm$ 31,0*	22,3	2,52 $\pm$ 0,15	16,3
<i>Acrocomia aculeata</i> + T	400	350,4 $\pm$ 6,4	776,01 $\pm$ 35,4 **	41,1	2,21 $\pm$ 0,11**	44,5

Valores expresados como Media $\pm$ EEM (error estándar de la media);
T: testosterona; PC: peso corporal (g); PP: peso de la próstata (mg),
% I: porcentaje de inhibición.
* p < 0,05, ** p < 0,01 comparación vs control (+), Test de la U de Mann Whitney

Ejemplo 11

El efecto de los ingredientes activos referidos en el ejemplo 1 sobre un modelo de osteoartritis se evaluó en el modelo de artritis inducida por mono-iodoacetato (MIA) en ratas. Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos con peso corporal entre 150 y 175 g adaptadas durante 7 días a las condiciones de laboratorio, las cuales se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos experimentales: un control negativo + (vehículo) y 7 grupos a los cuales se les indujo el daño con MIA; un control positivo, que solo recibió el vehículo, y otros 6 tratados: 3 de ellos con el extracto de los frutos de *A. crisper* y 3 con el de *A. aculeata* (100, 200 y 400 mg/kg).

El daño artrítico se indujo por una inyección única de MIA (50 μ l) en la cavidad sinovial de la rodilla izquierda. Un volumen equivalente de disolución salina se inyectó en la rodilla derecha. Los tratamientos se administraron mediante entubación gástrica (5 ml/kg), inmediatamente después de inducido el daño. Posteriormente, las ratas se sacrificaron bajo anestesia.

Para el estudio histopatológico la articulación de la rodilla izquierda se extrajo y se conservó en formol por 24 horas. Luego se descalcificó en EDTA disódico 0.5 M (pH 7,4) a 4 °C durante 4 semanas. Al completar la descalcificación la

articulación se seccionó en el plano longitudinal para obtener 2 mitades, siendo posteriormente incluidas en parafina, cortadas y coloreadas con Hematoxilina y Eosina y azul de toluidina para analizar el cartílago. El daño del cartílago se evaluó de acuerdo a su profundidad y extensión utilizando el puntaje modificado de Mankin, como sigue:

- **Profundidad (0-5):** 0-normal, 1-mínimo, afectando solo la zona superficial, 2-ligera invasión a la zona media superior solamente, 3-moderada invasión también en la zona media, 4-marcada invasión a la zona profunda, pero no a la línea divisoria o interfase existente entre el cartílago no calcificado y el calcificado (tidemark) y 5-severa degradación de todo el espesor hasta la línea divisoria existente entre el cartílago no calcificado y el calcificado.
- **Reducción de la tinción de la matriz (0-4):** 0-normal/ligera reducción de tinción, 1-coloración reducida en la capa radial, 2-coloración reducida en la matriz interterritorial, 3-coloración presente solo en la matriz pericelular y 4-coloración ausente.
- **Cambios del cartílago (0-6):** 0-normal, 1-superficie irregular, incluyendo fisuras en la capa radial, 2-pannus, 3-ausencia de capas superficiales de cartílago, 4-ligera desorganización (columnas celulares ausentes, algunos conglomerados pequeños superficiales), 5-fisura en la capa de cartílago calcificado, y 6-desorganización (estructura caótica, conglomerados y actividad osteoclástica).
- **Extensión de la inflamación (0-4):** 0-normal (no infiltrado), 1-mínima infiltración inflamatoria, 2-ligera infiltración, 3-moderada infiltración y 4-marcada infiltración.
- **Anormalidades celulares (0-3):** 0-normal, 1-hipercelularidad, incluyendo pequeños conglomerados superficiales, 2-conglomerados y 3-hipocelularidad.
- **Extensión del daño a la tibia (0-3):** 0-normal, 1-mínimo, 2-moderado y 3-severo.
- **Pérdida de hueso cortical o trabecular (0-4):** 0-normal, 1-pérdida mínima de hueso cortical en unos pocos sitios, 2-ligera pérdida de hueso cortical o trabecular, 3-moderada pérdida de hueso en muchos sitios y 4-marcada pérdida de hueso en muchos sitios con fragmentación y penetración en todo el espesor del proceso inflamatorio o la formación de *pannus* en el hueso cortical.
- **Presencia de Osteoclastos (0-4):** 0-normal (esencialmente no osteoclastos), 1-pocos osteoclastos (alineados en el 5 % de la mayoría de la superficie ósea afectada), 2-algunos osteoclastos (alineados entre el 5 y 25 % de la mayoría de superficies óseas afectadas), 3-muchos osteoclastos (alineados entre el 26-50 % de la mayoría de las superficies óseas afectadas) y 4-gran cantidad de osteoclastos (alineados en más del 50 % de la superficie ósea afectada).

Se calcularon las medias de los puntajes de los parámetros histológicos estudiados. Se calculó el puntaje histológico como el promedio de todas las variables histológicas evaluadas. La comparación entre los grupos controles y tratados se realizó con el test de la U de Mann Whitney.

Ningún animal del grupo control negativo y todos los del grupo control positivo mostraron evidencias de daño de acuerdo a las variables estudiadas (Tablas 12, 13 y 14). La administración de los extractos de los frutos de *A. crispera* y *A. aculeata* redujo significativamente el aumento del puntaje histológico inducido por el MIA en la articulación de la rodilla (50 % con la mayor dosis ensayada).

Estos resultados indican la eficacia de los extractos de frutos de *A. crispera* y *A. aculeata* en reducir significativa y marcadamente el aumento del daño inducido por una inyección única de MIA en la cavidad sinovial de la rodilla izquierda en ratas, lo que habla de su potencialidad terapéutica en la osteoartritis.

Tabla 12. Efectos de los extractos de *A. crispera* y *A. aculeata* sobre el puntaje histológico total

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Puntaje Histológico	I (%)
Control negativo	0	0**	-
Control positivo	0	3,55 ± 0,22	-
<i>Acrocomia crispera</i>	100	2,39 ± 0,24**	32,7
<i>Acrocomia crispera</i>	200	1,98 ± 0,27***	44,2
<i>Acrocomia crispera</i>	400	1,75 ± 0,20***	50,1
<i>Acrocomia aculeata</i>	100	2,37 ± 0,21**	33,2
<i>Acrocomia aculeata</i>	200	1,97 ± 0,23***	44,5
<i>Acrocomia aculeata</i>	400	1,76 ± 0,27***	50,0

Tanto el control positivo como todos los grupos tratados con los extractos recibieron inyecciones de mono-iodoacetato (MIA);

Valores expresados como Media ± EEM (error estándar de la media);

% I: porcentaje de inhibición;

p < 0,05; * p < 0,01 comparación vs control (+); Test de la U de Mann Whitney

Tabla 13. Efectos de los extractos de *A. crispa* y *A. aculeata* sobre el daño del cartílago

Tratamientos	Profundidad del daño		Reducción de la tinción de la matriz	
		I (%)		I (%)
Control negativo	0**		0**	
Control positivo	4,63±0,52		3,00±0,0	
<i>A. crispa</i> 100 mg/kg	2,63±0,5	43,2	1,88±0,6**	37,3
<i>A. crispa</i> 200 mg/kg	2,38±0,5*	48,6		50,0
<i>A. crispa</i> 400 mg/kg	2,05±0,6	55,7	1,15±0,5***	61,6
<i>A. aculeata</i> 100 mg/kg	2,61± 0,5	43,6	1,89±0,6**	37,0
<i>A. aculeata</i> 200 mg/kg	2,37±0,6	48,8	1,51±0,5***	49,6
<i>A. aculeata</i> 400 mg/kg	2,03±0,61	56,1	1,22±0,6***	59,3
Tanto el control positivo como todos los grupos tratados con los extractos recibieron inyecciones de mono-iodoacetato (MIA); Valores expresados como Media ± EEM (error estándar de la media); % I: porcentaje de inhibición; * p<0,05; **p< 0,01; *** p< 0,001, comparación vs control (+); Test de la U de Mann Whitney				

Tabla 14. Efectos de los extractos de *A. crispa* y *A. aculeata* sobre el daño del cartílago

Tratamientos	Cambios del cartílago		Extensión de la inflamación		Anormalidades celulares	
		I (%)		I (%)		I (%)
Control negativo	0**		0**		0**	
Control positivo	5,38±0,74		3,63±0,52		2,88±0,4	
<i>A. crispa</i> 100 mg/kg	3,88±0,6**	27,9	3,25±0,4**	10,5	1,88±0,6*	34,7
<i>A. crispa</i> 200 mg/kg	3,13±0,6***	41,8	2,88±0,4*	20,7	1,38±0,5*	52,1
<i>A. crispa</i> 400 mg/kg	2,75±0,46***	48,9	2,88±0,35*	20,7	1,05±0,5***	63,6
<i>A. aculeata</i> 100 mg/kg	3,85±0,6**	28,4	3,25±0,5**	10,5	1,89±0,7*	34,3
<i>A. aculeata</i> 200 mg/kg	3,12±0,7***	41,9	2,87±0,3*	20,8	1,38±0,6**	52,1
<i>A. aculeata</i> 400 mg/kg	2,74±0,5***	49,0	2,87±0,3*	20,9	1,03±0,4***	64,2
Tanto el control positivo como todos los grupos tratados con los extractos recibieron inyecciones de mono-iodoacetato (MIA); Valores expresados como Media ± EEM (error estándar de la media); % I: porcentaje de inhibición; * p<0,05; **p< 0,01; *** p< 0,001, comparación vs control (+); Test de la U de Mann Whitney						

Ejemplo 12

Se desarrollaron varias formulaciones con el ingrediente activo referido en el ejemplo 1 en dosis entre 50 y 1.000 mg, según se presenta a continuación: comprimidos conteniendo almidón de maíz, lactosa, talco, gelatina, croscarmelosa sódica, estearato de magnesio, carboximetilcelulosa; cápsulas duras y cápsulas blandas de gelatina.

- 5 Cremas conteniendo el ingrediente activo referido en el ejemplo 1 en concentraciones entre 0,1 y 90 %, y como excipientes petrolato sólido, alcohol cetílico, polisorbato, propilenglicol, glicerina, alcohol estearílico, laurilsulfato de sodio, metil y propil parabenos, sodio fosfato monobásico, agua purificada, edetato de sodio, carbopol, dimeticona, cera de abejas, trietanolamina. Lociones y champú, conteniendo el ingrediente activo referido en el ejemplo 1 en
- 10 concentraciones entre 0,1 y 90 %, y como excipientes, polisorbato, propilenglicol, carboximetilcelulosa, glicerina, laurilsulfato de sodio, metil y propil parabenos, sodio fosfato monobásico, agua purificada y trietanolamina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ingrediente activo obtenido a partir de los frutos de *Acrocomia crisper* y/o *Acrocomia aculeata*, ambas especies de la familia *Arecaceae*, el cual contiene una mezcla de ácidos grasos de 6 a 28 átomos de carbono (libres o en forma de acilglicéridos o ésteres etílicos), pudiendo contener además esteroides y alcoholes grasos de alto peso molecular, incluyendo mayoritariamente los ácidos: caprílico (C_{8:0}), cáprico (C_{10:0}), láurico (C_{12:0}), mirístico (C_{14:0}), palmítico (C_{16:0}), palmitoleico (C_{16:1}), esteárico (C_{18:0}), oleico (C_{18:1}), linoleico (C_{18:2}) y linolénico (C_{18:3}) en la siguiente proporción:

Componente	Contenido relativo (%)
Ácido caprílico (C _{8:0})	< 3,0
Ácido cáprico (C _{10:0})	< 3,0
Ácido láurico (C _{12:0})	30,0-40,0
Ácido mirístico (C _{14:0})	8,0-15,0
Ácido palmítico (C _{16:0})	5,0-12,0
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	< 3,0
Ácido esteárico (C _{18:0})	1,0-5,0
Ácido oleico (C _{18:1}) *	20,0-35,0 *
* Se determina y se reporta como ácido oleico a la mezcla del propio ácido oleico C _{18:1} (60-70 % del total); el linoleico C _{18:2} (25-40 % del total) y el linolénico C _{18:3} (<10 % del total).	

- 10 2. Ingrediente activo definido en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la inflamación aguda y crónica, del aumento del estrés oxidativo y de la osteoartritis.
3. Ingrediente activo definido en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la Hiperplasia Prostática Benigna y la prostatitis.
- 15 4. Composición farmacéutica **caracterizada por** contener de 50 mg a 1.000 mg del ingrediente activo definido en la reivindicación 1.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, caracterizada por estar formulada como forma oral sólida (cápsula dura, cápsula blanda, comprimido), semisólida (supositorio, crema, ungüento), o líquida (emulsión, suspensión, tintura, loción o champú).
6. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 y 5, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la inflamación aguda y crónica, del aumento del estrés oxidativo y de la osteoartritis.
- 20 7. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 y 5, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la Hiperplasia Prostática Benigna y la prostatitis.
8. Suplementos nutricionales **caracterizados por** contener entre 50 mg y 1.000 mg del ingrediente activo definido en la reivindicación 1.
- 25 9. Suplementos nutricionales según la reivindicación 8, **caracterizados por** su uso en forma de alimentos funcionales, nutracéuticos, dietéticos, aditivos para alimentos, bebidas, y cosméticos.
10. Formulaciones con funciones cosméticas, **caracterizadas por** contener el ingrediente activo definido en la reivindicación 1, en concentraciones entre 0,1 % y 90 %.
- 30 11. Formulaciones con funciones cosméticas según la reivindicación 10, administradas en forma de cremas, jabones, lociones, champús, geles de baño, geles, ungüentos, aceites corporales, protectores labiales y productos para el cuidado de la piel, incluidos los filtros solares.