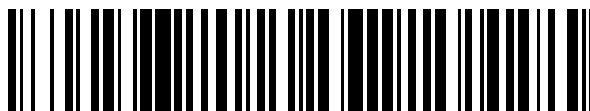


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 428**

51 Int. Cl.:

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 36/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2015** **E 15179206 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020** **EP 3050561**

54 Título: **Composiciones de ácido clorogénico y métodos para producir y usar las mismas en el tratamiento de la obesidad**

30 Prioridad:

30.07.2014 US 201462031135 P

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

08.06.2021

73 Titular/es:

KODIMULE, SHYAM PRASAD (50.0%)
Plot No. 101, Jigani Industrial Area, 2nd Phase,
Anekal Taluk
562106 Bangalore, IN y
HARAKANAHALLI, LINGARAJU BASAVEGOWDA
(50.0%)

72 Inventor/es:

KODIMULE, SHYAM PRASAD y
HARAKANAHALLI, LINGARAJU BASAVEGOWDA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 831 428 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

Composiciones de ácido clorogénico y métodos para producir y usar las mismas en el tratamiento de la obesidad

Campo de la invención

5 La invención se relaciona, en general, con composiciones de ácidos clorogénicos y con métodos para su uso y fabricación en el tratamiento de la obesidad. Más en particular, dichas composiciones se relacionan con formulaciones de ácidos clorogénicos a partir de un extracto de café verde.

Antecedentes

10 La obesidad es una afección que se manifiesta casi directamente como consecuencia del estilo de vida contemporáneo, que incluye una cultura de trabajo sedentario, una dieta de alto contenido en grasas y rica en calorías, escasez de ejercicio o actividad física regular, adicción a sustancias que crean hábito, tales como el tabaco y el alcohol, y niveles altos de estrés día a día. La obesidad ha alcanzado proporciones epidemiológicas a nivel global, con más de mil millones de adultos con sobrepeso - al menos 300 millones de ellos clínicamente obesos - y es un contribuyente importante a la carga global de enfermedad crónica y discapacidad. La miocardiopatía isquémica o las enfermedades cardiovasculares son las afecciones, a las que con frecuencia se hace referencia como enfermedades del estilo de vida, que tienen la obesidad como una de sus causas de raíz. La miocardiopatía isquémica es la primera causa de muerte en el mundo actualmente, según un reciente informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que puede encontrarse en <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) han matado a casi 17 millones de personas en el año 2011, es decir, 3 de cada 10 muertes. Las ECV están entre las causas principales de muerte. En India también, según la OMS. La importancia de controlar la obesidad es, por lo tanto, evidente.

20 Con frecuencia coexistente en los países en vías de desarrollo con la desnutrición, la obesidad es una afección compleja, con serias dimensiones sociales y psicológicas, que afecta virtualmente a todas las edades y grupos socioeconómicos. La obesidad y el sobrepeso plantean un riesgo importante para otras enfermedades crónicas graves, incluyendo la diabetes de tipo 2, la hipertensión y el accidente cerebrovascular y ciertas formas de cáncer. Las consecuencias para la salud van de un mayor riesgo de muerte prematura a afecciones crónicas graves que reducen la calidad de vida global.

25 Es, por lo tanto, seguro decir que el tratamiento de la obesidad ayudaría sustancialmente a reducir la mortalidad global, a aumentar la esperanza de vida y a aumentar la calidad de vida. Cambios dietéticos, ejercicio y actividad, cambio conductual, medicaciones de prescripción para la pérdida de peso y cirugía para la pérdida de peso son los brazos de tratamiento comunes para controlar la obesidad. El método de tratamiento a utilizar depende con frecuencia de la elección preferida de un individuo sometido a tratamiento, así como del nivel de obesidad.

30 La modalidad de tratamiento preferida para la pérdida de peso es la dieta y el ejercicio físico. Sin embargo, debido a los horarios ocupados y a los estilos de vida sedentarios, el seguimiento de los dos primeros métodos parece que se practica de un modo irregular. La cirugía para la pérdida de peso, por otra parte, es descartada por una gran parte de la población debido a los elevados costes que conlleva. Por lo tanto, hay un cambio gradual hacia un aumento en el uso de fármacos.

35 Los fármacos usados para la pérdida de peso generalmente alteran uno de los procesos fundamentales del cuerpo humano, tales como la regulación del peso alterando el apetito, el metabolismo o la absorción de calorías. Orlistat es la única medicación antiobesidad actualmente aprobada por la FDA para uso a largo plazo. Reduce la absorción de grasa intestinal inhibiendo la enzima lipasa pancreática. Rimonabant y Sibutramina son los otros fármacos que habían sido inicialmente aprobados para el tratamiento de la obesidad, pero fueron eventualmente prohibidos debido a cuestiones de seguridad. Debido a los potenciales efectos colaterales, se recomienda que los fármacos antiobesidad sólo se prescriban para obesidad cuando se espera que los beneficios del tratamiento superen a su riesgo.

40 Lo que se necesita en la técnica, por lo tanto, es una intervención basada en la nutrición que proporcione una alternativa barata para ayudar a la pérdida de peso y al control del peso. Los inventores de la presente invención, por lo tanto, contemplan una composición herbolaria efectiva en cuanto a coste y segura o un suplemento dietético usados para el control de la obesidad.

45 T. Murase *et al.*, Am J Physiol Endocrinol Metab 300: E122-E133, 2011, investigaron los efectos de los polifenoles del café (CPP), que son abundantes en el café y se consumen a nivel mundial, sobre la acumulación de grasa corporal inducida por la dieta.

50 WO 2006/079056 A1 se relaciona con composiciones herbolarias que contienen *Hoodia gordonii* e ingredientes adicionales, tales como extracto de vaina de café verde.

55 Z. Hui *et al.*, Separation Science and Technology, 45: 794-800, 2010, realizaron una evaluación sobre el rendimiento y las características de separación de nueve resinas macroporosas para el enriquecimiento y la purificación de los ácidos clorogénicos totales de extractos de desecho del tabaco (*Nicotiana tobaccum L.*).

US 2011/0223281 A1 describe un método de control del peso corporal en humanos administrando una cantidad de extracto de café verde descafeinado efectiva para tratar a un sujeto.

Compendio de la invención

5 En vista de lo que se necesita en la técnica, un objeto general de la invención es proporcionar una composición de ácidos clorogénicos que comprende aproximadamente ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-feruloilquínico (5-FQA), ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) y ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA).

10 Otro objeto de la invención es proporcionar una composición de ácidos clorogénicos que comprende aproximadamente un $7,23 \pm 0,23\%$ de ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), aproximadamente un $25,43 \pm 0,18\%$ de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), aproximadamente un $9,51 \pm 0,10\%$ de ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), aproximadamente un $1,84 \pm 0,13\%$ de ácido 5-feruloilquínico (5-FQA), aproximadamente un $2,79 \pm 0,09\%$ de ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), aproximadamente un $1,90 \pm 0,05\%$ de ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) y aproximadamente un $3,74 \pm 0,11\%$ de ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA).

15 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de ácidos clorogénicos para el control de la obesidad.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición de ácidos clorogénicos para el control de la obesidad que sea efectiva en cuanto a costes y no tóxica.

20 Es aún otro objeto de la invención proporcionar una composición de isómeros clorogénicos de extracto de vaina de café verde indio para reducir el peso corporal, para la eliminación de tejido graso abdominal, para la eliminación del TAP, para reducir los niveles de colesterol, para mejorar los niveles de HDL y los niveles de glucosa en el suero.

Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar un proceso para la preparación de una composición de ácidos clorogénicos.

Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar un método para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas a la obesidad.

25 Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes gracias a la siguiente descripción, que no pretende limitar el alcance de la presente descripción.

Descripción detallada

La presente invención queda caracterizada en las reivindicaciones adjuntas.

30 La invención se relaciona, en general, con composiciones de ácidos clorogénicos y métodos para su uso en una variedad de aplicaciones terapéuticas y preventivas. Los métodos de preparación de composiciones de ácidos clorogénicos son también características de la presente invención.

35 Las composiciones de ácidos clorogénicos de la invención pueden derivar de una variedad de biomateriales de plantas. Diversas fuentes de plantas que contienen ácido clorogénico son semillas de girasol, té, arándanos, madreleña, hoja de guayusa, bambú (*Phyllostachys edulis*), melocotón, ciruelas, brezo (*Colluna vulgaris*), cilantro, patatas, tomates, manzanas, tabaco, berenjena, flores de lonicera (jinyinhua), corteza de Eucommia, fruto de la gardenia, flor del crisantemo, fruto del Crataegus, hojas de Artemisia, hojas de Epimedium, hojas de alcachofa, raíz de bardana, raíz de diente de león, raíz de Echinacea, semillas de lino, fresas, piña, cacahuetes y trigo.

40 En una realización no limitante de la invención, las composiciones de ácidos clorogénicos derivan de vainas de café verde. Tal como se usa aquí, el término vainas de café "verde" se refiere a vainas de café inmaduras. Se han procesado éstas por métodos húmedos o secos para eliminar la pulpa externa y el mucílago. Cuando están inmaduras, las vainas son de color verde. Cuando están maduras, tienen un color de marrón a amarillo o rojizo. Según dichas realizaciones, las partes de las plantas de café (por ej., vainas, tallos, hojas y raíces de café) usadas para el procedimiento de la presente invención pueden ser frescas y/o desecadas. Típicamente, se selecciona el extracto del grupo de ácidos clorogénicos que se extraen por extracción alcohólica, hidroalcohólica y acuosa. Además, se prepara el extracto usando técnicas seleccionadas del grupo que incluye, aunque sin limitación, agitación en caliente, extracción Soxhlet, percolación, decocción, maceración y extracción con fluidos supercríticos. Se pueden derivar las composiciones de ácidos clorogénicos de la invención usando una variedad de solventes, incluyendo, aunque sin limitación, solventes alcohólicos, solventes acuosos y solventes hidroalcohólicos. En algunas realizaciones, el solvente usado para la extracción es un solvente orgánico polar y/o un solvente orgánico no polar, que incluye, aunque sin limitación, agua, metanol, etanol, butanol, hexano, acetona, cloroformo, éter de petróleo, acetonitrilo y sus combinaciones. En una realización de la presente invención, se someten las vainas de café verde a extracción para obtener una combinación de siete isómeros de ácido clorogénico.

Las composiciones de ácidos clorogénicos de la invención comprenden proporciones específicas de especies de ácidos clorogénicos. Dichas especies de ácidos clorogénicos incluyen, aunque sin limitación, ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-feruloilquínico (5-FQA), ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-di CQA), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-di CQA), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-di CQA). Las composiciones de ácidos clorogénicos de la invención comprenden aproximadamente un 7,23 ±0,23% de ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), aproximadamente un 25,43±0,18% de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), aproximadamente un 9,51±0,10% de ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), aproximadamente un 1,84±0,13% de ácido 5-feruloilquínico (5-FQA), aproximadamente un 2,79±0,09% de ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), aproximadamente un 1,90±0,05% de ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) y aproximadamente un 3,74±0,11% de ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA).

Los fitoconstituyentes incluidos en la composición de la presente descripción están en la forma seleccionada del grupo que incluye, aunque sin limitación, extractos, gránulos, polvos, semisólidos, fracciones aisladas, aceites, soluciones, suspensiones, emulsiones y semisólidos. En una realización, la composición es una mezcla compleja obtenida de la vaina de café verde indio.

Se pueden administrar las composiciones de ácidos clorogénicos de la presente invención por diversas vías, incluyendo, aunque sin limitación, la tópica, oral, bucal, sublingual, parenteral, rectal e inhalatoria. Las composiciones pueden estar en forma de una forma de dosificación que incluye, aunque sin limitación, polvos, píldoras, tabletas, gránulos, cápsulas, películas delgadas, soluciones, esprays, jarabes, antitusígenos, trociscos, pastillas, gomas de mascar, pastas, vaporizadores, suspensiones, emulsiones, ungüentos, cremas, lociones, linimentos, geles, gotas, parches tópicos, parches bucales, perlas, gominolas, geles, soles, inyecciones y similares. Típicamente, la composición comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de ácidos clorogénicos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones terapéuticas y preventivas. En algunas realizaciones, se administran las composiciones de ácidos clorogénicos de la invención a un sujeto para prevenir la oxidación (actividad antioxidante). En otras realizaciones, las composiciones de la invención hallan un uso en el tratamiento, la prevención o el control de la obesidad. La frase "tratar la obesidad", tal como se usa aquí, se refiere a prevenir o reducir la grasa corporal, prevenir o reducir el aumento de peso, prevenir o reducir la absorción de grasa de la dieta, reducir el índice de masa corporal (IMC), reducir la grasa abdominal y prevenir el aumento de peso por una dieta rica en grasas. En realizaciones, se administran las composiciones de ácidos clorogénicos en el control de afecciones hiperlipémicas, incluyendo, aunque sin limitación, la reducción de los lípidos de baja densidad, del colesterol y de los triglicéridos en suero, y/o la elevación de los lípidos de alta densidad (HDL). En otras realizaciones, se administran las composiciones de ácidos clorogénicos para prevenir o reducir la acumulación de grasa en el hígado. En otras realizaciones, se administran las composiciones de ácidos clorogénicos de la invención para reducir el estrés oxidativo o regular los niveles de glucosa en sangre. El término "reducir", tal como se usa aquí, se refiere a cualquier disminución medible que se produzca como resultado de administrar las composiciones de la invención, en relación a la ausencia de dicha administración. De forma significativa, las composiciones de la invención son no tóxicas y no mutagénicas.

Se describe además la presente descripción a la luz de los siguientes ejemplos no limitativos, que se exponen únicamente con fines de ilustración y no se han de considerar como limitantes del alcance de la descripción.

Ejemplo 1: Procedimiento para la preparación de la mezcla compleja de la presente descripción (Complejo CGA-7)

Se apilaron 100 kg de vaina de café verde en un extractor vertical de 1,0 KL. El fondo del extractor comprendía una placa perforada sobre la que se fijó una tela de filtración. Se añadieron aproximadamente seis volúmenes de lecho de alcohol etílico al 70% v/v. Se continuó con la extracción a 75-78°C durante aproximadamente 7-8 h con circulación continua de extracto con bomba de transferencia. Tras completarse la extracción, se filtró el extracto a través de un filtro de vela SS de 5 micras y se recogió el extracto transparente en un tanque receptor limpio. Se volvió a extraer el lecho añadiendo 4 volúmenes de lecho de alcohol etílico al 70% 3 veces más y se mantuvo la temperatura a 75-78°C durante aproximadamente 7-8 h. Se recogieron todos los extractos en un tanque receptor y se concentró el extracto combinado en un reactor a vacío a 80±5°C hasta que el extracto estuvo libre de alcohol etílico. Se llevó la solución hasta el TDS hasta un 20-25% p/v con agua desionizada.

Se pasó la solución de extracto anterior a través de 500 litros de resina XAD-4 y se cargó el extracto a través de la resina a una velocidad de 2-3 volúmenes de lecho/hora. Se lavó la resina con 2-3 volúmenes de lecho de agua desionizada a una velocidad de 2-3 volúmenes de lecho/hora. Se eluyó el extracto con 2-3 volúmenes de lecho de alcohol etílico al 70% v/v a una velocidad de 2-3 volúmenes de lecho/hora. Se concentró el eluyente en un reactor a 80±5°C hasta quedar libre de alcohol. Se llevó el TDS de la solución hasta el 25-30% p/v y se deshidrató por aspersión a 215±5°C para obtener la mezcla compleja de CGA-7.

Se determinó la composición de los isómeros de ácido clorogénico por el método de HPLC y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 1 Tabla de picos que muestra los tipos de ácidos clorogénicos

Pico	Nombre	Tiempo de ret.	Área	% Área	Altura	% Altura
1	3 CQA	3,209	1904533	12,529	395880	13,745
2	5 CQA	5,017	7126683	46,883	1394953	48,431
3	4 CQA	5.218	2612578	17.187	521622	18.110
4	5 FQA	7.489	703664	4.629	136587	4.742
5	3,4 Di CQA	11.049	941037	6.191	162285	5.634
6	3,5 Di CQA	11.549	694548	4.569	111103	3.857
7	4,5 Di CQA	12.659	1218027	8.013	157843	5.480
Total			15201070	100	2880273	100

Se determinó la impronta de la composición de los isómeros de ácidos clorogénicos mediante el método LC-MS/MS y se muestran los resultados obtenidos en la Figura 1 (Cromatograma LC del Complejo CGA-7) y la Figura 2 (Cromatograma MS del Complejo CGA-7).

Ejemplo 2: Estudios *in-vitro* de la mezcla compleja (complejo CGA-7) de la presente descripción:

Ensayo antioxidante:

Ensayo de captación de DPPH

Se determinó la capacidad de captación de radicales libres del Complejo CGA-7 usando el ensayo de captación de DPPH (Sarojini *et al.*, 2011). Se preparó una solución de DPPH en metanol al 95%. Se recogió la solución recién preparada de DPPH en tubos de ensayo y se añadieron preparaciones de café y se incubaron durante 20 min. Se leyó la absorbancia a 515 nm usando un espectrofotómetro. Se preparó blanco que contenía el mismo volumen de mezcla de reacción sin ninguna muestra estudiada. Se calculó el porcentaje de captación usando la fórmula

$$\% \text{ Captación} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Donde A_c era la absorbancia del control (blanco sin extracto) y A_s era la absorbancia en presencia del extracto.

Actividad quelante de metales

Se estimó la quelación de iones ferrosos por los extractos de plantas mediante el método siguiente. Se añadió Complejo CGA-7 a una solución de FeCl_2 2 mM (0,05 ml), se inició la reacción mediante adición de ferrozina 5 mM (0,2 ml). Se agitó entonces la mezcla vigorosamente y se mantuvo durante 10 min a temperatura ambiente [26]. Se midió la absorbancia de la solución a 562 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de la formación del complejo ferrozina- Fe^{2+} .

$$\text{Índice de quelación (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Donde A_c era la absorbancia del control (blanco sin extracto) y A_s era la absorbancia en presencia del extracto.

Actividad de captación de aniones superóxido

Se midió la actividad de captación de aniones superóxido del Complejo CGA-7 según el método de (Nishimiki *et al.*, 1972). Se preparan todas las soluciones en este experimento usando tampón fosfato (pH 7,4). Se añaden 1 ml de NBT (156 μM), 1 ml de NADH (468 μM) y 3 ml de muestras de ensayo a todos los tubos de ensayo. Se inicia la reacción añadiendo 100 μl de PMS (60 μM) y se incuba la mezcla a 25°C durante 5 min, seguido de medición de la absorbancia a 560 nm. Se calculó el porcentaje de captación usando la fórmula

$$\% \text{ Captación} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Donde A_c era la absorbancia del control (blanco sin extracto) y A_s era la absorbancia en presencia del extracto.

Ensayo del poder reductor

Se determinó la capacidad reductora del Complejo CGA-7. Se mezclaron las muestras de ensayo con 2,5 ml de tampón

fosfato 0,2 M (pH 6,6) y 2,5 ml de ferricianuro de potasio al 1% $[K_3Fe(CN)_6]$. Se incubó la mezcla de reacción a 50°C durante 20 min, se añadieron 2,5 ml de ácido tricloroacético al 10%, se centrifugó después (650 rpm a temperatura ambiente) durante 10 min. Se mezcló la solución de la capa superior (2,5 ml) con 2,5 ml de agua destilada y 0,5 ml de $FeCl_3$ al 0,1%. Se midió la absorbancia a 700 nm. Cuanto mayor es la absorbancia a 700 nm, mayor capacidad de poder reductor (Oyaizu, 1986).

Actividad antioxidante total

El método del fosfomolibdeno se basa en la reducción de Mo (VI) a Mo (V) por el compuesto antioxidante y la formación de un complejo verde de fosfato/Mo (V) con una absorción máxima a 695 nm. Se determinará la actividad antioxidante de la muestra de ensayo mediante el método del fosfomolibdeno como describen Prieto *et al.*, (1999). Resumiendo, se combinan 0,3 ml de muestra de ensayo con 3 ml de solución de reactivo (ácido sulfúrico 0,6M, fosfato de sodio 28mM y molibdato de amonio 4mM). Se incubará la mezcla de reacción a 95°C durante 90 min y se enfriará hasta la temperatura ambiente. Se mide la absorbancia de la solución a 695 nm frente al blanco. Se expresa la capacidad antioxidante total como el número de equivalentes de ácido ascórbico (AAE).

Resultados:

Nombre de la muestra: Complejo CGA-7

Tabla 2 Ensayos *in-vitro* del Complejo CGA-7

Ensayo de captación de DPPH			Ensayo de captación de superóxido			Quelación de metales		
Conc. en $\mu g/ml$	Absorbancia @517 nm	% Inhibición	Conc. en $\mu g/ml$	Absorbancia @560 nm	% Inhibición	Conc. en $\mu g/ml$	Absorbancia @562 nm	% Inhibición
Blanco	1,801		Blanco	0,337		Blanco	0,702	
100 μg	0,886	50,81	100 μg	0,110	67,36	100 μg	0,726	-3,42
	1,007	44,09		0,102	69,73		0,739	-5,27
	0,985	45,31		0,120	64,39		0,746	-6,27
	0,967	46,31		0,123	63,50		0,734	-4,56
	0,985	45,31						
		45,97			66,25			-4,88

Ensayo antioxidante total				Ensayo del poder reductor		
Conc. en $\mu g/ml$	Absorbancia @695 nm	AAE (μg)		Conc. en $\mu g/ml$	Absorbancia @700 nm	AAE (μg)
100 μg	0,078	14,78		100 μg	0,545	58,55
	0,078	14,80			0,590	63,37
	0,080	14,95			0,598	64,16
	0,074	14,50			0,560	60,09
	0,078	14,80			0,555	59,63
		14,76				61,16

Ejemplo 3: Estudios *in-vivo* del Complejo CGA-7 de la presente descripción:

A) Estudio de toxicidad oral aguda en ratas con el Complejo CGA-7

Se evaluó la toxicidad oral a una sola dosis del Complejo CGA-7 en ratas Wistar albinas. Se realizó un ensayo límite en el que ratas hembra recibían una sola administración oral del Complejo CGA-7 a una dosis de 2.000 mg/kg de peso corporal. Tras la dosificación, se observó a las ratas de la prueba límite a diario y se las pesó semanalmente. Se

realizó un examen de necropsia macroscópico a todos los animales de la prueba límite en el momento de la eutanasia programada (día 14). No se produjo mortalidad durante la duración de la prueba límite. Además, no se observaron hallazgos internos macroscópicos significativos en la necropsia en el día de estudio 14.

5 En las condiciones experimentales descritas, se estimó que la DL_{50} oral aguda del complejo CGA-7 era mayor de 2.000 mg/kg en la rata.

B] Toxicidad a 90 días con dosis repetidas con el complejo CGA-7

10 Se realizó un estudio de toxicidad oral a 90 días con dosis repetidas con el complejo CGA-7 en ratas Wistar tanto machos como hembras, seguido de un período de recuperación de 14 días, para determinar la toxicidad en los órganos diana. Sin nivel de efectos adversos observados (NOAEL) y reversibilidad de los signos de toxicidad tras el período de recuperación. Los resultados de los estudios de toxicidad oral aguda en ratas albinas Wistar indicaron que la DL_{50} oral aguda del complejo CGA-7 se estimaba que era mayor de 2.000 mg/kg en las ratas. En base a los resultados anteriores, se seleccionaron tres dosis como 250, 500 y 1.000 mg/kg p.c. Se seleccionó la vía de administración oral porque es la vía terapéutica propuesta.

Observaciones

15 Signos clínicos de toxicidad: No se observaron signos clínicos de toxicidad en todos los grupos de animales machos y hembras a través del período de dosificación de 90 días y durante el período de recuperación de 14 días.

Mortalidad: Todos los grupos de animales machos y hembras sobrevivieron a través del período de dosificación de 90 días y durante el período de recuperación de 14 días.

20 Peso corporal: Se registraron los pesos corporales desde los 0 hasta los 90 días para todos los grupos y se continuó para el día 97 y el 104 para los grupos de reversión.

Aumento de peso corporal: Se vio una disminución significativa en el aumento de peso corporal en todos los grupos de animales tratados con Complejo CGA-7 a 250, 500 y 1.000 mg/kg p.c. tanto en machos como en hembras cuando se comparó con el control. Durante el período de reversión, los animales también mostraron una significativa reducción en el aumento de peso corporal hasta el normal cuando se comparó con el grupo de reversión control.

25 Ingestión de alimentos: No se observó ningún efecto del tratamiento en todos los grupos de animales sobre el consumo de alimentos a través del período de dosificación de 90 días y durante el período de recuperación de 14 días.

Observaciones funcionales: Los parámetros observacionales funcionales realizados no mostraron cambios en todos los grupos de animales machos y hembras.

Análisis de sangre

30 Hematología: No se observaron cambios significativos en todos los grupos de animales machos y hembras cuando se comparó con los de los grupos control respectivos. No se observaron cambios dependientes de la dosis.

Química clínica: No se observaron cambios significativos en todos los grupos de machos y hembras cuando se comparó con los de los grupos control respectivos.

35 Análisis de orina: No se observaron cambios en el análisis de orina de todos los grupos de animales machos y hembras cuando se comparó con los de los grupos control respectivos.

Sacrificio y patología

Peso de órganos relativo: No se observaron cambios significativos en todos los grupos de animales machos y hembras cuando se comparó con los de los grupos control respectivos. No se observaron cambios dependientes de la dosis.

40 Patología macroscópica: No se observaron cambios macroscópicos en todos los grupos de animales machos y hembras.

Estudios histopatológicos: No se vieron cambios en el cerebro, el hígado, el corazón, el bazo, los riñones, los ovarios, el intestino grueso y las glándulas adrenales en los animales tratados con Complejo CGA-7 a 1.000 mg/kg p.c. cuando se comparó con el control.

45 Conclusión: En base a los hallazgos anteriores, se vio que el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) del complejo CGA-7 era de 1.000 mg/kg p.c. para ratas Wistar tanto hembras como machos cuando se dio oralmente durante 90 días, seguido de un período de recuperación de 14 días.

C] Actividad antiobesidad del complejo CGA-7:

Objetivo: El objetivo era investigar el efecto del complejo CGA-7 frente a ratas alimentadas con una dieta rica en grasas.

Procedimiento:

Modelo: Dieta rica en grasas en ratas

Composición de la dieta rica en grasas

25% Manteca

5 5% Aceite de soja

5% Almidón

65% Alimento para ratas comercial normal

Se dividieron ratas Wistar machos en seis grupos con seis animales en cada grupo.

Tabla 3 Especificaciones de grupos

M. N°	Grupo	Sustancia de ensayo
1	Grupo I	Alimento normal + Vehículo (agua destilada)
2	Grupo II	Dieta rica en grasas + Vehículo (agua destilada)
3	Grupo III	Dieta rica en grasas + Fármaco estándar (orlistat 30 mg/kg)
4	Grupo IV	Dieta rica en grasas + Complejo CGA-7 (50 mg/kg)
5	Grupo V	Dieta rica en grasas + Complejo CGA-7 (100 mg/kg)
6	Grupo VI	Dieta rica en grasas + Complejo CGA-7 (150 mg/kg)

10

Parámetros evaluados

Se midió el peso corporal una vez cada 2 días. Se midió la ingestión de alimento diariamente durante 42 días.

El día 43, se mantuvo a todos los animales en ayunas durante la noche antes del sacrificio. Se recogió sangre por punción en el plexo retroorbitario. Se separó el suero por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se valoró el suero en cuanto a glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL. También se calcularon la LDL y el índice aterogénico. Se aislaron y pesaron el hígado, el mesentéreo, el tejido adiposo pardo (TAP), los cojinetes grasos perirrenales izquierdo y derecho, los cojinetes epididimales izquierdo y derecho. Se aisló el hígado y se valoró en cuanto a los niveles de triglicéridos y colesterol hepáticos.

15

Análisis estadístico

20 Se expresaron los datos como la media $\pm$ SEM y se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett usando el GraphPad Prism versión 5. Se consideraron las diferencias significativas a un valor de p de $< 0,05$.

Resultados

Tabla 4 Efecto del Complejo CGA 7 sobre el peso corporal en ratas machos

Grupos	Peso final	Peso inicial	Diferencia en el peso corporal
Grupo I	220,5 $\pm$ 2,54	150,1 $\pm$ 2,67	68,41 $\pm$ 1,18
Grupo II	230,3 $\pm$ 5,57	137,0 $\pm$ 0,32	112,0 $\pm$ 4,51****a
Grupo III	218,4 $\pm$ 2,65	130,3 $\pm$ 0,56	88,01 $\pm$ 3,68***b
Grupo IV	211,7 $\pm$ 2,42	136,1 $\pm$ 0,62	75,65 $\pm$ 3,44***b
Grupo V	229,7 $\pm$ 1,94	163,8 $\pm$ 2,33	65,88 $\pm$ 2,14***b
Grupo VI	199,0 $\pm$ 2,08	138,4 $\pm$ 1,07	60,63 $\pm$ 2,89***b

Se expresan los valores en términos de SEM $\pm$ Media. Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001.

Tabla 5 Efecto del Complejo CGA 7 sobre la ingestión media de alimento en ratas machos

Grupos	Ingestión media de alimento g/rata
Grupo I	14,93 $\pm$ 0,77
Grupo II	8,26 $\pm$ 0,51*** ^a
Grupo III	8,54 $\pm$ 0,40 ^{nsb}
Grupo IV	7,78 $\pm$ 0,45 ^{nsb}
Grupo V	8,96 $\pm$ 0,45 ^{nsb}
Grupo VI	6,98 $\pm$ 0,35 ^{nsb}

5

Se expresan los valores en términos de SEM $\pm$ Media. Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001 ^{ns} no significativo.

Tabla 6 Efecto del Complejo CGA 7 sobre el peso orgánico del hígado, la grasa mesentérica, el tejido adiposo pardo (TAP), los cojinetes grasos perirrenales y el cojinete graso epididimal.

Grupo s	Hígado	Grasa mesentérica	TAP	Tejido de los cojinetes grasos perirrenales		Cojinete graso epididimal	
				Derecho	Izquierdo	Derecho	Izquierdo
Grupo I	3,87 $\pm$ 0,18	0,59 $\pm$ 0,06	0,06 $\pm$ 0,004	0,30 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,01
Grupo II	4,50 $\pm$ 0,19 ^{a*}	1,31 $\pm$ 0,12 ^{**a}	0,24 $\pm$ 0,01 ^{**a}	1,22 $\pm$ 0,12 ^{**a}	0,85 $\pm$ 0,05 ^{**a}	0,58 $\pm$ 0,04 ^{**a}	0,60 $\pm$ 0,02 ^{**a}
Grupo III	3,47 $\pm$ 0,11 ^{**b}	0,98 $\pm$ 0,03 ^{*b}	0,19 $\pm$ 0,01 ^{**b}	0,65 $\pm$ 0,04 ^{*b}	0,61 $\pm$ 0,05 ^{*b}	0,48 $\pm$ 0,01 ^{*b}	0,50 $\pm$ 0,01 ^{**b}
Grupo IV	3,56 $\pm$ 0,10 ^{**b}	1,01 $\pm$ 0,07 ^{*b}	0,20 $\pm$ 0,01 ^{*b}	0,52 $\pm$ 0,03 ^{**b}	0,54 $\pm$ 0,03 ^{**b}	0,44 $\pm$ 0,02 ^{**b}	0,46 $\pm$ 0,03 ^{**b}
Grupo V	3,57 $\pm$ 0,12 ^{**b}	1,0 $\pm$ 0,04 ^{*b}	0,17 $\pm$ 0,01 ^{**b}	0,43 $\pm$ 0,02 ^{**b}	0,41 $\pm$ 0,03 ^{**b}	0,41 $\pm$ 0,02 ^{**b}	0,38 $\pm$ 0,02 ^{**b}
Grupo VI	3,39 $\pm$ 0,10 ^{**b}	1,0 $\pm$ 0,07 ^{*b}	0,17 $\pm$ 0,01 ^{**b}	0,36 $\pm$ 0,02 ^{**b}	0,38 $\pm$ 0,03 ^{**b}	0,40 $\pm$ 0,03 ^{**b}	0,37 $\pm$ 0,01 ^{**b}

Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001 **P<0,01 * P<0,05.

Tabla 7 Efecto del Complejo CGA 7 sobre los niveles séricos de glucosa, colesterol total, triglicérido, HDL-c y LDL-c (mg/dl)

Grupos	Glucosa	Colesterol total	Triglicéridos	HDL-c	LDL-c
Grupo I	84,53 $\pm$ 4,62	56,00 $\pm$ 1,44	70,56 $\pm$ 3,59	24,56 $\pm$ 0,88	17,33 $\pm$ 1,78
Grupo II	131,00 $\pm$ 5,88*** ^a	78,08 $\pm$ 1,40*** ^a	137,7 $\pm$ 7,95*** ^a	16,73 $\pm$ 0,59*** ^a	33,81 $\pm$ 2,11*** ^a
Grupo III	109,7 $\pm$ 3,93 ^{**b}	63,38 $\pm$ 0,95*** ^b	77,63 $\pm$ 4,27*** ^b	20,47 $\pm$ 1,08 ^{*b}	27,39 $\pm$ 1,07 ^{nsb}

Grupo IV	89,29±2,79*** ^b	62,23±1,74*** ^b	86,32±5,06*** ^b	20,22±0,82* ^b	25,12±2,33* ^b
Grupo V	87,63±3,28*** ^b	58,16±2,18*** ^b	75,36±4,17*** ^b	20,50±1,10* ^b	22,59±2,67*** ^b
Grupo VI	86,23±3,50*** ^b	45,20±2,37*** ^b	62,98±2,97*** ^b	20,51±0,94* ^b	12,09±2,31*** ^b

Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001 **P<0,01 * P<0,05

5 Tabla 8 Efecto del Complejo CGA 7 sobre el índice aterogénico

Grupo	Índice aterogénico
Grupo I	1,30±0,10
Grupo II	3,72±0,22*** ^a
Grupo III	2,20±0,20*** ^b
Grupo IV	2,18±0,15*** ^b
Grupo V	1,91±0,23*** ^b
Grupo VI	1,22±0,14*** ^b

Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001.

10 Tabla 9 Efecto del Complejo CGA 7 sobre los niveles hepáticos de colesterol y triglicéridos

Grupo	Colesterol hepático	Triglicéridos hepáticos
Grupo I	23,92±1,50	50,51±2,16
Grupo II	69,53±2,54*** ^a	87,93±3,56*** ^a
Grupo III	49,66±3,28*** ^b	64,64±3,44*** ^b
Grupo IV	48,48±3,58*** ^b	57,68±4,25*** ^b
Grupo V	44,61±4,45*** ^b	59,91±2,73*** ^b
Grupo VI	28,53±2,69*** ^b	36,04±4,42*** ^b

Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001 **P<0,01 * P<0,05

15 Conclusión

Complejo CGA 7

- ❖ Reduce el peso corporal
- ❖ Elimina tejido graso abdominal
- ❖ Elimina tejido adiposo pardo

20

- ❖ Reduce los niveles de colesterol
- ❖ Mejora los niveles de HDL c

❖ Restaura los niveles de glucosa

Ejemplo 4: Evaluación clínica del Complejo CGA-7 de la presente descripción: Se realizó una prueba clínica prospectiva, aleatorizada, doble ciego y controlada con placebo para evaluar la eficacia y seguridad del Complejo CGA-7 en la reducción del peso corporal en pacientes obesos.

- 5 Los sujetos tenían que completar 5 visitas, incluyendo 1 visita de cribado y 4 visitas programadas, es decir, visita de cribado, Visita 1 (basal) - Día 1, Visita 2 - Día 14 $\pm$ 3, Visita 3 - Día 28 $\pm$ 3, Visita 4 - Día 56 $\pm$ 3. La visita de cribado consistía en un impreso de consentimiento del paciente, múltiples pruebas de laboratorio, exámenes físicos, mediciones antropométricas y criterios de inclusión/exclusión de comprensión. Tras el cribado, se aleatorizó a los sujetos y se les asignó al Grupo A y al Grupo B para el tratamiento con Complejo CGA-7 y placebo, respectivamente.
- 10 Se registraron los resultados primarios de reducción del peso corporal y del IMC en la visita 2, visita 3 y visita 4. Se realizó también la valoración de calidad de vida basal (SF- 36). Durante las visitas 2 y 3, se registraron las mediciones antropométricas, el examen físico, los sucesos adversos y las medicaciones concomitantes, de haberlas. En la visita final, se registraron exámenes físicos, mediciones antropométricas, perfil lipídico, glucosa en sangre en ayunas, HbA1c, valoración de la calidad de vida, sucesos adversos y medicaciones concomitantes. Se recogieron las tabletas no usadas.
- 15

Se validó el efecto del Complejo CGA-7 en ausencia de ejercicio, paseando y sin restricciones de dieta durante el curso de la prueba.

Tamaño de la muestra

- 20 Se cribó a un total de 42 pacientes y entre ellos se incluyó a 30 en el estudio según los criterios de inclusión. Se aleatorizó a los sujetos y se asignó a un número igual de sujetos al grupo A de tratamiento con Complejo CGA-7 y al grupo B de tratamiento con placebo. Dos pacientes fueron eliminados de ambos grupos sin ninguna información durante el estudio.

Análisis estadístico

- 25 Se usó la prueba t pareada para medir el cambio con respecto a la línea basal. Se usó ANOVA para observar los cambios en los diversos parámetros tras las visitas de seguimiento programadas, seguido de una prueba *post-hoc* apropiada.

Resultados del peso corporal

- 30 En el grupo tratado con Complejo CGA-7, el peso corporal medio basal era de 80,6 $\pm$ 10, el cual se redujo hasta 76,57 $\pm$ 10,2 el día 56. Mientras tanto, en el grupo tratado con placebo, el día 56 la reducción de peso era desdénfiable en comparación con el peso corporal medio basal.

Hubo un 5% de reducción en el peso corporal observado en el grupo tratado con Complejo CGA-7 en comparación con (Figura 3; % Reducción significativo en IMC).

IMC

- 35 El IMC medio del grupo tratado con Complejo CGA-7 en la línea basal era de 30,53 $\pm$ 0,62, el cual se redujo significativamente a 28,97 $\pm$ 0,73 en la última visita. Se vio que el mismo estaba ligeramente disminuido en los sujetos tratados con placebo.

El grupo tratado con Complejo CGA-7 ha mostrado un 5,10% de reducción en el IMC el día 56, mientras que era sólo del 0,9% en el grupo tratado con placebo (Figura 4; % Reducción significativo en IMC).

Circunferencia de la cintura

- 40 Hubo una reducción significativa en la circunferencia de la cintura el día 56 en el grupo tratado con el Complejo CGA-7 en comparación con la línea basal, que era de 103,28 $\pm$ 4,14 y 99,85 $\pm$ 5,36, respectivamente. Mientras tanto, el grupo tratado con placebo había mostrado una mejora insignificante en la Circunferencia de la Cintura.

El Complejo CGA-7 ha mostrado un 3,32% de reducción en la circunferencia de la cintura, que es del 0,27% en el grupo tratado con placebo (Figura 5; % Reducción significativo en la Circunferencia de la Cintura).

- 45 Circunferencia de la cadera

La circunferencia de la cadera mejoró significativamente en el grupo tratado con el Complejo CGA-7 en comparación con el grupo tratado con placebo. La circunferencia de la cadera media basal era de 105,85 $\pm$ 4,88, que se redujo a 104,78 $\pm$ 4,88 después de 56 días de tratamiento con el Complejo CGA-7.

- 50 Se ha visto un 1,01% de reducción en el grupo tratado con el Complejo CGA-7, que fue sólo del 0,13% en el grupo tratado con placebo (Figura 6; % Reducción significativo en la Circunferencia de la Cadera).

Los resultados recogidos han mostrado que el Complejo CGA 7 tiene una mejora significativa en el perfil lipídico. El nivel medio de triglicéridos en la línea basal era de $151 \pm 39,39$, el cual disminuyó significativamente a $134,43 \pm 38,15$ el Día 56 tras el tratamiento con Complejo CGA 7, y el porcentaje de niveles de triglicéridos reducido en comparación con la línea basal es del 10,97%.

- 5 Los valores medios del colesterol total en la línea basal eran de $172,07 \pm 32,99$, los cuales disminuyeron a $162,36 \pm 32,10$ el Día 56 tras el tratamiento con Complejo CGA 7, y el porcentaje de los niveles de colesterol total reducidos en comparación con la línea basal hasta la visita 4 es del 5,64%.

El nivel medio de HDL en la línea basal era de $37,91 \pm 8,29$, el cual aumentó significativamente hasta $42 \pm 7,75$ el Día 56 tras el tratamiento con el Complejo CGA 7, y el porcentaje del nivel de HDL aumentado es del 10,78%.

- 10 El nivel medio de LDL en la línea basal era de $103,96 \pm 27,18$, que disminuyó significativamente a $88,5 \pm 29,62$ el Día 56 tras el tratamiento con el Complejo CGA 7, y el porcentaje de los niveles de LDL reducidos en comparación con la línea basal hasta la visita 4 es del 14,87%.

El nivel medio de VLDL en la línea basal era de $30,2 \pm 7,87$, que disminuyó significativamente a $26,88 \pm 7,63$ el Día 56 tras el tratamiento con el Complejo CGA 7, y el porcentaje de los niveles de VLDL reducidos en comparación con la línea basal hasta la visita 4 es del 10,99%.

- 15

Los resultados recogidos han mostrado que el Placebo tiene menos mejora en el perfil lipídico. El nivel de triglicéridos ha disminuido ligeramente en comparación con la línea basal hasta la visita 4. El valor de triglicéridos en la línea basal era de $150,71 \pm 45,96$, disminuyó a $149,71 \pm 45,86$ el Día 56 tras el tratamiento con Placebo y el porcentaje del nivel de triglicéridos reducido en comparación con la línea basal hasta la visita 4 es del 0,7%.

- 20 El nivel total de colesterol disminuyó ligeramente en comparación con la línea basal hasta la visita 4. El valor del colesterol total en la línea basal era de $174,21 \pm 32,03$, disminuyó a $173,57 \pm 31,95$ el Día 56 tras el tratamiento con Placebo y el porcentaje del nivel de colesterol total reducido en comparación con la línea basal hasta la visita 4 es del 0,4%.

- 25 El nivel medio de HDL ha mostrado que no hay cambios en comparación con la línea basal hasta la visita 4. El valor de HDL en la línea basal era de $36,14 \pm 7,26$ y de $36,79 \pm 6,92$ el Día 56 tras el tratamiento con Placebo.

La LDL media disminuyó ligeramente en comparación con la línea basal hasta la visita 4. El valor de LDL en la línea basal era de $107,93 \pm 27,03$ y disminuyó a $106,84 \pm 26,88$ el Día 56 tras el tratamiento con Placebo. El porcentaje del nivel de LDL reducido en comparación con la línea basal hasta la visita 4 es del 1,0%.

- 30 El nivel medio de VLDL estaba ligeramente disminuido en comparación con la línea basal hasta la visita 4. El valor de VLDL en la línea basal era de $28,13 \pm 11,79$, disminuyó a $29,94 \pm 9,17$ tras el tratamiento con Placebo y el porcentaje del nivel de VLDL total reducido en comparación con la línea basal hasta la visita 4 es del 6,3%.

El Complejo CGA 7 es estadísticamente significativo en la reducción de triglicéridos, colesterol, LDL y VLDL con respecto al Placebo.

El Complejo CGA 7 era estadísticamente significativo en el aumento de HDL con respecto al Placebo.

- 35 Se muestra el efecto del Complejo CGA 7 sobre el perfil lipídico en la Figura 7. El Complejo CGA 7 exhibía una significativa reducción en los niveles de triglicéridos, colesterol y LDL y un significativo aumento en los niveles de HDL.

Tabla 10 Efecto del Complejo CGA7 sobre el peso corporal, el IMC, la circunferencia de la cintura y la cadera y los triglicéridos, el colesterol, la LDL y la VLDL en suero

40

M. N°	Parámetros	Visita 1	Visita 4	Diferencia	% Disminución
1	Peso corporal (kg)	$80,6 \pm 10$	$76,57 \pm 10,2$	4,03	5,00
2	Índice de masa corporal (IMC kg/m ²)	$30,53 \pm 0,62$	$28,97 \pm 0,73$	1,56	5,10
3	Circunferencia de la cintura (cm)	$103,28 \pm 4,14$	$99,85 \pm 5,36$	3,43	3,32

4	Circunferencia de la cadera (cm)	105,85±4,88	104,78±4,88	1,07	1,01
5	Triglicéridos (mg/dl)	151±39,39	134,43±38,15	16,57	10,97
6	Colesterol (mg/dl)	172,07±32,99	162,36±32,10	9,71	5,64
7	LDL (mg/dl)	103,96±27,18	88,5±29,62	15,46	14,87
8	VLDL (mg/dl)	30,2±7,87	26,88±7,63	3,32	10,99

Se expresan los valores en términos de Media±SD

Tabla 11 Efecto del Complejo CGA 7 sobre la HDL sérica

M. Nº	Parámetros	Visita 1	Visita 4	Diferencia	% Aumento
1	HDL (mg/dl)	37,91±8,29	42±7,75	4,09	10,78

5 Se expresan los valores en términos de Media±SD

Tabla 12 Efecto del Placebo sobre el peso corporal, el IMC, la circunferencia de la cintura y la cadera y los triglicéridos, el colesterol, la LDL y la VLDL en suero

M. Nº	Parámetros	Visita 1	Visita 4	Diferencia	% Disminución
1	Peso corporal (kg)	74,03±9,7	73,39±9,4	0,64	0,864
2	Índice de masa corporal (IMC kg/m ²)	31,01±1,10	30,73±1,18	0,29	0,90
3	Circunferencia de la cintura (cm)	100,85±5,89	100,57±4,81	0,28	0,27
4	Circunferencia de la cadera (cm)	104,92±7,19	104,78±5,02	0,14	0,13
5	Triglicéridos (mg/dl)	150,71±45,96	149,71±45,86	1	0,7
6	Colesterol (mg/dl)	174,21±32,03	173,57±31,95	0,64	0,4
7	LDL (mg/dl)	107,93±27,03	106,84±26,88	1,1	1,01
8	VLDL (mg/dl)	28,13±11,79	29,94±9,17	1,81	6,4

Se expresan los valores en términos de Media±SD

Tabla 13 Efecto del Placebo sobre la HDL en suero

M. N°	Parámetros	Visita 1	Visita 4	Diferencia	% Aumento
1	HDL (mg/dl)	36,14±7,26	36,79±6,92	0,65	1,7

Se expresan los valores en términos de Media±SD

Conclusión

5 Complejo CGA 7

- ❖ Es efectivo en la reducción del peso corporal
- ❖ Reduce el IMC y las circunferencias de la cadera y la cintura
- ❖ Mejora el perfil lipídico aumentando el nivel sérico de la HDL y disminuyendo los niveles séricos de triglicéridos, colesterol y LDL

10 ❖ Es seguro, sin efectos no deseados.

Ejemplo 5 - El complejo CGA 7 es superior al extracto de vainas de café en el control de la obesidad y de los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, HDL y glucosa.

La obesidad es un desajuste del equilibrio energético y se considera primariamente como un trastorno del metabolismo de los lípidos. La obesidad y las comorbilidades asociadas a la obesidad siguen siendo un problema de salud global. Es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, debido a su asociación con un mayor riesgo de diversas enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipemia y cánceres. Estimaciones recientes en los EE.UU. indican que aproximadamente un tercio de la población de adultos es obesa. La Organización Mundial de la Salud (OMS) asigna la obesidad como epidemia global. Globalmente, aproximadamente 1.600 millones de adultos tienen sobrepeso y al menos 400 millones de adultos son obesos. Además, la OMS proyecta que hacia 2015 aproximadamente 2.300 millones de personas tendrán sobrepeso y que más de 700 millones serán obesos.

El café es ampliamente utilizado como bebida en todo el mundo. Tiene numerosos beneficios de salud contra la obesidad y trastornos metabólicos como la diabetes de tipo 2. El principal principio activo del café son ácidos clorogénicos con diferentes isómeros presentes en él. El ácido clorogénico es altamente antioxidante y proporciona protección contra la cirrosis hepática, la aterosclerosis, la infección bacteriana y la obesidad. El complejo CGA-7 contiene más de un 52% de siete isómeros diferentes de ácido clorogénico, extraídos de la vaina de café verde. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* respaldan que el ácido clorogénico tiene actividad antiobesidad.

A este respecto, se evaluó complejo CGA-7 que contenía más de un 52% de ácido clorogénico (extracto patentado de *Coffea arabica* de VIDYA HERBS PVT LTD) frente a ratas SD machos alimentadas con una dieta rica en grasas en comparación con extracto de vainas de café verde.

Objetivo

Investigar el papel del extracto herbal patentado con Complejo CGA-7 de *Coffea arabica* de VIDYA HERBS frente a ratas SD machos alimentadas con una dieta rica en grasas en comparación con extracto de vainas de café verde (EVCV).

35 Materiales y métodos

- Material: - Complejo CGA 7
- Modelo: - Dieta rica en grasas (DRG) en ratas SD

Composición de la dieta rica en grasas: - 200 g de grasa/kg (170 g de aceite de manteca + 30 g de aceite de maíz) y 1% de colesterol.

40 Tabla 1 Agrupamiento de animales

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg, oral)
I	Control + Vehículo	Agua destilada 10 ml/kg
II	DRG + Vehículo	Agua destilada 10 ml/kg

III	DRG + GCBE	100 mg/kg
IV	DRG + CGA7	50 mg/kg
V	DRG + CGA7	100 mg/kg
VI	DRG + CGA7	150 mg/kg

Se dividió a 36 ratas SD machos en 6 grupos que contenían seis cada uno. Se alimentó con dieta de pienso normal para ratas al grupo 1 durante 42 días. Se alimentó con DRG a los grupos 2-6 durante 42 días. Se dio el tratamiento respectivo a todos los grupos durante 42 días como se describe en la tabla.

5 Parámetros evaluados:-

- Se midió el peso corporal una vez cada 2 días. Se midió la ingestión de alimento diariamente durante 42 días.
 - El día 43, se mantuvo a todos los animales en ayunas durante la noche antes del sacrificio. Se recogió sangre por punción en el plexo retroorbitario. Se separó el suero por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos.
 - Se valoró el suero en cuanto a glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL.
- 10 ■ Se aislaron el hígado, la grasa mesentérica, el tejido adiposo pardo (TAP), los cojinetes grasos perirrenales izquierdo y derecho y los cojinetes epididimales izquierdo y derecho y se pesaron.

Análisis estadístico: - Se expresaron los datos como la media $\pm$ SEM y se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett usando el GraphPad Prism versión 5. Se consideraron las diferencias significativas a un valor de p de < 0,05.

15 Resultados

Se expresan los valores en términos de la SEM $\pm$ Media. Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001, **P<0,01

Tabla 2 Efecto del Complejo CGA 7 sobre el peso corporal en ratas machos

Grupo	Tratamiento	Ingestión de alimento (g/rata)
I	Control + Vehículo	24,05 $\pm$ 0,13
II	DRG + Vehículo	17,15 $\pm$ 0,08***a
III	DRG + GCBE (100 mg/kg)	17,88 $\pm$ 0,35* ^b
IV	DRG + CGA7 (50 mg/kg)	17,48 $\pm$ 0,08
V	DRG + CGA7 (100 mg/kg)	17,75 $\pm$ 0,10
VI	DRG + CGA7 (150 mg/kg)	17,34 $\pm$ 0,07

20

Se expresan los valores en términos de la SEM $\pm$ Media. Se analizaron los datos por ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Dunnett. Número de animales en cada grupo n=6. ^aComparación hecha con el grupo control. ^bComparación hecha con el grupo de la dieta rica en grasas. ***P<0,001, *P<0,05

Tabla 3 Efecto del Complejo CGA 7 sobre la ingestión media de alimento

	Control + Vehículo	293,8 $\pm$ 1,23	145,9 $\pm$ 0,79	147,9 $\pm$ 1,09
	DRG + Vehículo	360,0 $\pm$ 1,21	143,6 $\pm$ 0,62	216,3 $\pm$ 1,61***a
	DRG + GCBE (100 mg/kg)	345,7 $\pm$ 5,06	144,1 $\pm$ 0,61	201,7 $\pm$ 4,49**b
	DRG + CGA7 (50 mg/kg)	346,5 $\pm$ 3,22	146,1 $\pm$ 0,50	200,3 $\pm$ 3,51** ^b

	DRG + CGA7 (100 mg/kg)	311,3±2,27	144,1±0,99	167,2±3,02*** b
	DRG + CGA7 (150 mg/kg)	304,2±1,81	145,1±1,08	159,1±2,30*** b

Tabla 4 Efecto del Complejo CGA 7 sobre el peso orgánico del hígado, la grasa mesentérica, el tejido adiposo pardo (TAP), los cojinetes grasos perirrenales y el cojinete graso epididimal

Grupo	Tratamiento	Hígado (por 100 g)	TAP (por 100 g)	Grasa mesentérica (por 100 g)	Grasa epididimal (por 100 g)	Grasa perirrenal (por 100 g)
I	Control + Vehículo	2,688±0,07	0,04±0,002	0,57±0,07	0,44±0,06	0,36±0,07
II	DRG + Vehículo	6,467±0,12***a	0,15±0,001***a	1,81±0,03***a	1,94±0,02***a	2,48±0,01***a
III	DRG + GCBE (100 mg/kg)	5,832±0,17* ^b	0,12±0,002* ^b	1,55±0,01** ^b	1,69±0,02** ^b	2,09±0,06** ^b
IV	DRG + CGA7 (50 mg/kg)	5,598±0,19** ^b	0,12±0,004* ^b	1,54±0,06** ^b	1,66±0,02** ^b	2,07±0,07** ^b
V	DRG + CGA7 (100 mg/kg)	4,115±0,19*** ^b	0,08±0,013*** ^b	1,13±0,08*** ^b	1,21±0,09*** ^b	1,14±0,14*** ^b
VI	DRG + CGA7 (150 mg/kg)	3,298±0,17*** ^b	0,06±0,001*** ^b	0,99±0,01*** ^b	1,18±0,03*** ^b	0,98±0,07*** ^b

- 5 La Figura 8 representa el patrón de aumento de peso y de ingestión media de alimento, donde el complejo CGA7 a 100 y 150 mg/kg muestra una disminución en el aumento de peso en comparación con los grupos de DRG y GCBE, que es estadísticamente significativa. No hay diferencia en la ingestión de alimento entre DRG y

- 10 La Figura 9 representa cambios en el peso del hígado y del tejido adiposo. El complejo CGA7 a 100 y 150 mg/kg de dosis inhibe la deposición de grasa en el hígado, el TAP, la grasa mesentérica y la grasa epididimal y perirrenal en comparación con los grupos de DRG y GCBE, lo que es estadísticamente significativa.

La Figura 10 representa cambios en el nivel de colesterol, TG, glucosa y HDL en el suero sanguíneo. Los grupos de complejo CGA7 a 100 y 150 mg/kg muestran una disminución en el colesterol, los TG y la glucosa en comparación con los grupos DRG y GCBE, que es estadísticamente significativa. Los grupos tratados con complejo CGA7 tienen

- 15 El extracto de vainas de café verde es bien tolerado como tratamiento antiobesidad y se usa ampliamente para ello. El ácido clorogénico es el principio activo farmacológico principal de la vaina de café verde. Hay falta de evidencias científicas del papel del ácido clorogénico en el control de la obesidad y el metabolismo de los lípidos. El complejo CGA7 contiene principalmente más de un 52% de siete isómeros de ácidos clorogénicos. Se ha investigado el efecto del complejo CGA7 en ratas SD machos obesas inducidas con dieta rica en grasas comparando con extracto de vainas de café verde.

- 20 Este estudio *in vivo* reveló que el complejo CGA7 a la dosis de 100 mg/kg y 150 mg/kg ha mostrado un 25,3% y un 26,4% de reducción en el aumento de peso corporal, respectivamente, que es estadísticamente significativo en comparación con el grupo tratado con GCBE (6,7%). Los grupos tratados con el complejo CGA7 tienen también un menor peso de tejido adiposo pardo y adiposo blanco extensivamente en comparación con el grupo tratado con GCBE.

- 25 El tejido adiposo visceral descarga cantidad de ácidos grasos libres (FFA) y citoquinas/hormonas en la vena. Además, estos FFA se transportan al hígado, en donde interaccionan con los hepatocitos y diversas células inmunes. También se cree que el peso corporal y el peso de los tejidos adiposos se correlacionan positivamente con los niveles de leptina e insulina. Cho *et al.* estudiaron que los niveles plasmáticos de leptina e insulina eran altos en el grupo tratado con DRG, los cuales se reducían significativamente mediante la suplementación con ácido clorogénico.

- 30 Debido a la resistencia a la leptina, hay un aumento en los FFA del tejido adiposo al hígado. Donde los FFA se convierten en triglicéridos y causan hígado graso por una mayor lipogénesis, un resultado de la hiperinsulinemia y de la menor oxidación de los FFA. De sotillo y Hadley dicen que el ácido clorogénico mejora la tolerancia a la glucosa y disminuye los lípidos plasmáticos y hepáticos sin cambiar el nivel de triglicéridos en el tejido adiposo de ratas Zucker a 5 mg.kg (i.v.). En este estudio, que se conforma en donde el grupo DRG ha mostrado aumento en el tamaño y el

peso del hígado. El complejo CGA7 ha mostrado una significativa reducción en el peso del hígado y de otros tejidos adiposos cuando se da oralmente a 100 mg/kg y 150 mg/kg en comparación con GCBE. El complejo CGA7 tiene niveles reducidos de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero de una manera marcada y un mejor nivel de HDL en comparación con el grupo tratado con GCBE.

5 Conclusión

El complejo CGA7 es superior al extracto de vainas de café en el control de la obesidad. CGA reduce en un 25,3% y un 26,4% el aumento de peso corporal a 100 mg/kg y 150 mg/kg, respectivamente. El complejo CGA también demuestra una capacidad para reducir el nivel sérico de colesterol, triglicéridos y glucosa, y para reducir la acumulación de grasa en el hígado y reducir el tejido adiposo pardo y blanco. El complejo CGA mejora los niveles séricos de HDL.

10 **Ejemplo 6** - Estudios de acoplamiento molecular del complejo CGA-7 con proteína asociada a la masa de grasa y a la obesidad (LTO)

Introducción

El aumento de peso y la obesidad son importantes factores de riesgo para afecciones y enfermedades que van desde la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus de tipo 2 hasta la aterosclerosis y las secuelas de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Shoelson *et al.*, 2007). Fisiológicamente, la obesidad es un desorden del equilibrio de energía y se considera primariamente como un trastorno del metabolismo lipídico (Strader *et al.*, 1998). La afección se asocia a un número creciente de enzimas implicadas en las rutas del metabolismo lipídico. Representan un rico acervo de dianas terapéuticas potenciales para la obesidad (Shi & Burn, 2004; Melnikova & Wages, 2006). La proteína asociada a la masa grasa y la obesidad, también conocida como dioxigenasa dependiente de alfa-cetoglutarato (FTO), es una enzima que parece tener correlación con la obesidad en humanos (Frayling *et al.*, 2007). La FTO contribuye a la regulación de la velocidad metabólica global, al gasto de energía y a la homeostasis energética. La FTO contribuye a la regulación del tamaño corporal y de la acumulación de grasa en el cuerpo.

Se ha indicado que el extracto de vainas de café verde tiene potentes propiedades antiobesidad e hipogliceridémicas por estudios *in vivo*. Los ácidos clorogénicos son un grupo importante de polifenoles que se encuentran en la vaina del café verde bruta y contribuyen significativamente a la eficacia farmacológica del extracto de vainas de café. El objetivo del presente estudio era explorar la actividad antiobesidad *in silico* del complejo CGA-7 a partir de extracto de vainas de café verde dirigiendo la FTO.

Materiales y métodos

Se utilizaron herramientas AutoDock para generar mallas, calcular la puntuación de acoplamiento y evaluar los conformadores de inhibidores unidos en el sitio activo de AMPK como dianas para la actividad antidiabética. El acoplamiento automatizado es una interfaz de usuario gráfica. Se empleó AutoDock 4,2 para obtener puntuaciones de acoplamiento y unión, el cual se implementa por el método del algoritmo genético de Lamarckian. Se diseñaron las moléculas de ligando, es decir, los siete isómeros de ácido clorogénico (Figura 1), y Orlistat y se analizó la estructura usando ACD/Chemsketch. Se usó el servidor PRODRG para minimizar la energía de los compuestos farmacológicos y se prepararon coordenadas 3D. Se tomó el archivo de la estructura de la proteína (PDB ID: 3LFM) de PDB y se editó eliminando los heteroátomos usando el visor de moléculas Python. Se centró el mapa de mallas en residuos particulares de la proteína y se generó con AutoGrid. Según el algoritmo genético, se dejó que todas las torsiones rotaran durante el acoplamiento. Se aplicaron el algoritmo genético Lamarckian y los métodos pseudo-Solis y Wets para la minimización, usando parámetros de defecto (Rodríguez e Infante, 2011).

40 Resultados

Las siete isoformas de ácido clorogénico en CGA-7 se unen todas muy eficientemente en el bolsillo activo de FTO (Figura 3). El resultado obtenido es comparable a la orientación del fármaco estándar Orlistat. La energía de unión requerida es menor que la del Orlistat y la firme unión de isoformas es evidente por la formación de más enlaces de hidrógeno de moléculas de ligando en comparación con el fármaco estándar (Tabla 1).

45 La Figura 1 muestra la estructura de moléculas de ligando: (1) ácido 3-O-Cafeoilquinico; (2) ácido 4-O- Cafeoilquinico; (3) ácido 5-O-Cafeoilquinico; (4) ácido 5-O-Feruloilquinico; (5) ácido 3,4-O-Dicafeoilquinico; (6) ácido 3,5-O-Dicafeoilquinico; (7) ácido 4,5-O-Dicafeoilquinico; y (8) Orlistat

Tabla 1. Resultados del acoplamiento molecular de la proteína asociada a la masa grasa y a la obesidad

Molécula	Parámetros termodinámicos					
	Energía de unión	Eficiencia de ligandos			Enlaces H	Interacciones
Ácido 3-O-Cafeoilquínico	-8,04	-0,32	1,28	-11,32	5	Leu78 His73 Arg80 Gln468
Ácido 4-O-Cafeoilquínico	-7,01	-0,28	7,21	-10,3	7	Leu78 Lys391 Asp467 Arg80
Ácido 5-O-Cafeoilquínico	-7,43	-0,3	3,56	-10,7	6	Arg80 Leu78 His73 Arg80 Gln468
Ácido 5-O-Feruloilquínico	-5,56	-0,21	84,65	-8,84	5	His73 Arg80 Gln468 Leu78
Ácido 3,4-O-Dicafeoilquínico	-5,32	-0,21	126,75	-8,6	4	His73 Gln468 Arg80 Asp208
Ácido 3,5-O-Dicafeoilquínico	-5,88	-0,16	48,78	-10,95	6	His73 Gln468 Lys74 Lys391
Ácido 4,5-O-Dicafeoilquínico	-7,73	-0,26	2,14	-12,81	5	Arg80 Leu78 Lys391 His73
Orlistat (Est.)	-4,65	-0,14	390,87	-11,21	3	Ser95 Arg80

Conclusión

CGA-7 como una mezcla compleja de 7 isoformas de ácido clorogénico de extracto de vainas de café verde es efectivo en interaccionar con la proteína asociada a la masa grasa y la obesidad (FTO) más eficientemente que el fármaco estándar Orlistat, y por ello puede servir como un mejor candidato para el desarrollo de fármacos antiobesidad en el futuro.

Se explican las presentes realizaciones y las diversas características y detalles ventajosos de las mismas en relación con las realizaciones no limitantes de la descripción. Se omiten descripciones de componentes y técnicas de procesamiento bien conocidos para no oscurecer innecesariamente las presentes realizaciones. Los ejemplos aquí utilizados pretenden únicamente facilitar una comprensión de las formas en que pueden practicarse las presentes realizaciones y permitir además que los expertos en la técnica practiquen las presentes realizaciones. Por consiguiente, no se han de considerar los ejemplos como limitantes del alcance de las presentes realizaciones.

La anterior descripción de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general de las presentes realizaciones que otros pueden, aplicando los conocimientos actuales, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones dichas realizaciones específicas sin desviarse del concepto genérico, y, por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones deben comprenderse, y pretenden comprenderse, dentro del significado e intervalo de equivalentes de las realizaciones descritas. Hay que entender que la fraseología o terminología aquí empleada tiene fines de descripción y no de limitación.

Cualquier discusión de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos y similares que se haya incluido en esta memoria descriptiva tiene únicamente el fin de proporcionar un contexto para la descripción. No se ha de tomar como una admisión de que cualesquiera o todas de estas materias forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante a la descripción al existir en cualquier momento antes de la fecha de prioridad de esta solicitud.

Aunque se ha puesto aquí un considerable énfasis en las características particulares de esta descripción, se apreciará que se pueden hacer diversas modificaciones y que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones preferidas sin desviarse de los principios de la descripción. Éstas y otras modificaciones en la naturaleza de la descripción o las realizaciones preferidas serán evidentes para los expertos en la técnica gracias a la descripción que aquí se da, mediante la cual hay que entender de manera distinta que la materia descriptiva anterior ha de ser interpretada únicamente como ilustrativa de la descripción y no como limitación.

Ejemplo 7 - Estudios de acoplamiento *in silico* de isómeros de CGA7 con lipasa pancreática humana

Introducción

Orlistat inhibe potente y específicamente la lipasa pancreática, que es responsable, junto con una colipasa pancreática, de la destrucción de los triglicéridos de la dieta para dar los ácidos grasos y monoglicéridos absorbibles. Se une covalentemente al sitio activo sobre la lipasa pancreática y forma un complejo estable (Cudrey *et al.*, 1993). El complejo induce un cambio conformacional en la enzima que lleva a una estructura de tipo tapa sobre la lipasa, exponiendo así el sitio activo catalítico. Esta operación conduce a acilación de un grupo hidroxilo sobre la carga de residuos de serina en el sitio activo de la enzima, para hacerla inactiva como lipasa. La lipasa inactivada es incapaz de hidrolizar grasas a ácidos grasos y monoglicéridos, lo que lleva a su paso con las heces (Hadvary *et al.*, 1998). En el presente estudio, con objeto de evaluar la inhibición comparativa de la lipasa pancreática por el fármaco estándar Orlistat y el complejo CGA-7, que es una mezcla de 7 isómeros de ácido clorogénico (Figura 1), hemos realizado el análisis de acoplamiento *in silico*.

Metodología

Se utilizaron herramientas AutoDock para generar mallas, calcular puntuación de acoplamiento y evaluar los conformadores de inhibidores unidos en el sitio activo de la lipasa pancreática como dianas para la actividad antiobesidad. El acoplamiento automatizado es una interfaz de usuario gráfica. Se empleó AutoDock 4,2 para obtener las puntuaciones de acoplamiento y unión, el cual se implementa por el método del algoritmo genético de Lamarckian. Se diseñaron las moléculas de ligando, es decir, los siete isómeros de ácido clorogénico (Figura 1) y Orlistat y se analizó la estructura usando ACD/Chemsketch. Se usó el servidor PRODRG para minimizar la energía de los compuestos farmacológicos y se prepararon coordenadas 3D. Se tomó el archivo de la estructura proteica (PDB ID: 1LPB) (Figura 2) de PDB y se editó eliminando los heteroátomos usando el visor de moléculas Python. Se centró el mapa de mallas en residuos particulares de la proteína y se generó con AutoGrid. Según el algoritmo genético, se dejó que todas las torsiones rotaran durante el acoplamiento. Se aplicaron el algoritmo genético de Lamarckian y los métodos pseudo-Solis y Wets para la minimización, usando parámetros de defecto (Rodríguez e Infante, 2011).

Resultado

Los isómeros de CGA-7 exhibían una pronunciada actividad de inhibición de la lipasa, como es evidente por los parámetros termodinámicos estudiados. La interacción de isómeros con residuos de bolsillo activos requería menor energía en comparación con el fármaco estándar Orlistat. Los isómeros formaron dos enlaces de hidrógeno en el

bolsillo activo de la proteína. Se representan los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del acoplamiento molecular de la lipasa pancreática con CGA-7 y Orlistat

Molécula	Parámetros termodinámicos					
	Energía de unión KJmol ⁻¹	Eficiencia de ligandos KJ/mol ⁻¹	Constante inhibitoria	Energía intermolecular KJ/mol ⁻¹	Enlaces H	Interacciones
Ácido 3-O-Cafeoilquínico	-4,64	-0,19	399,38	-7,92	4	Lys238 Asn10 HOH1112
Ácido 4-O-Cafeoilquínico	-3,69	-0,15	1,96	-6,98	5	Glu385 Ile371 Lys373 Glu370 HOH938
Ácido 5-O-Cafeoilquínico	-3,22	-0,13	4,37	-6,5	5	Ile9 Lys39 BOG451 HOH1112
Ácido 5-O-Feruloilquínico	-3,39	-0,13	3,25	-6,68	4	HOH938 Ile371 Lys373 HOH1097
Ácido 3,4-O-Dicafeoilquínico	-1,3	-0,04	111,7	-6,37	6	Asn406 Lys373 His354 Asn406
Ácido 3,5-O-Dicafeoilquínico	-2,58	-0,07	12,9	-7,65	4	Glu15 Ile9 Asn240
Ácido 4,5-O-Dicafeoilquínico	-2,06	-0,06	31,13	-7,13	4	Arg65 Glu64
Orlistat (Est.)	-1,03	-0,03	176,96	-7,59	2	Lys238

Conclusión

- 5 Es claramente evidente por los estudios de acoplamiento que los isómeros del complejo CGA-7 son muy efectivos en la inhibición de la actividad lipasa interaccionando más firmemente con los residuos de aminoácidos del bolsillo activo de la enzima en comparación con el fármaco estándar Orlistat.

Referencias

- 10 1. Brown JP. A review of the genetic effect of occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat Res* 1980;75(3):243-277.
2. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ.* 1985;63(6):965-81.
3. Jovtchev G, Stergios M, Schubert I. A comparison of N-methyl- N-nitrosourea induced chromatid aberrations and micronuclei in barley meristems using FISH techniques. *Mutat Res* 2002;517:47-51.
- 15 4. Kamboj VP. Herbal Medicine. *Curr Sc* 2000;78(1):35-37.
5. OECD Guideline for the testing of chemicals- Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents; TG 408, 21st September 1998.

6. OECD Guideline No. 420, "Acute Oral Toxicity" -Fixed Dose Procedure 17th December 2001.
7. Sultan AO, Çelik TA. Genotoxic and antimutagenic effects of Capparis spinosa L. on the Allium cepa L. root tip meristem cells. *Caryologia*, 2009;262: 114-123.
- 5 8. Song S. J., Choi S., Park T. (2014) Decaffeinated Green Coffee Bean Extract Attenuates Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-14.
9. Vongsak B., Sithisarn P., Gritsanapan W. (2013) Simultaneous Determination of Crypto-Chlorogenic Acid, Isoquercetin, and Astragalin Contents in Moringa oleifera Leaf Extracts by TLC-Densitometric Method. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-7.
- 10 10. Narita Y., Inouye K. (2013) Degradation Kinetics of Chlorogenic Acid at Various pH Values and Effects of Ascorbic Acid and Epigallocatechin Gallate on Its Stability under Alkaline Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 61 (4), 966-972.
11. Farah A., Paulis T. D., Martin P. R., Trugo L. C.(2005) Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1505-1513.
- 15 12. Sarojini BK, Vidyagayatri M, Darshanraj CG, Bharath BR, Manjunatha H, DPPH scavenging assay of novel 1,3-disubstituted-1H-pyrazol-5-ols and their in silico studies on some proteins involved in Alzheimer's disease signaling cascade. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2011,7,214-224
13. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 26: 1199-1200
14. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K, The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1972,46, 849-854
- 20 15. Oyaizu M, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 1986,44, 307-315
16. Prieto P, Pineda M and Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 1999,269,337-341.
- 25 17. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316 (5826): 889-94.
- 30 18. Melnikova I, Wages D (2006). Antiobesity therapies. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 369-370.
19. Rodriguez A, Infante D (2011). Characterization in silico of flavonoids biosynthesis in Theobroma cacao L. *Network Biology* 1: 34-45.
- 35 20. Shi Y, Burn P (2004). Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 695-710.
21. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A (2007). Obesity, inflammation and insulin resistance, *Gastroenterology* 132(6): 2169-80.
22. Strader CD, Hwa JJ, Van Heek M, Parker EM (1998). Novel molecular targets for the treatment of obesity. *Drug Discovery Today* 3: 250-256.
- 40 23. Cudrey CH van Tibeurgh, Gargouri Y & Verger R (1993). Inactivation of pancreatic lipase by amphiphilic reagents 5-(dodecylthio)-2-nitrobenzoic acid and tetrahydrolipstatin. Dependence upon partitioning between micellar and oil phases. *Biochemistry*, 32: 800-808.
- 45 24. Hadvary P, Lengsfeld H & Wolfer H (1988). Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem. J.*, 256: 357-361

REIVINDICACIONES

1. Una composición de ácidos clorogénicos que comprende:
aproximadamente un $7,23 \pm 0,23\%$ de ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), aproximadamente un $25,43 \pm 0,18\%$ de ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), aproximadamente un $9,51 \pm 0,10\%$ de ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), aproximadamente un $1,84 \pm 0,13\%$ de ácido 5-feruloilquínico (5-FQA), aproximadamente un $2,79 \pm 0,09\%$ de ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), aproximadamente un $1,90 \pm 0,05\%$ de ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA) y aproximadamente un $3,74 \pm 0,11\%$ de ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA).
2. La composición de la reivindicación 1, en donde se formula la composición como una píldora, una tableta, una cápsula, una perla, un trocisco, una gominola, un gel, un líquido, un chicle, un polvo, una tira soluble o una espuma.
3. La composición de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de la obesidad.
4. Un método para preparar una composición de ácidos clorogénicos a partir de extracto de café verde, que comprende:
proporcionar vainas de café verde;
someter las vainas de café verde a extracción en un solvente alcohólico a $75-78^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 7 a 8 horas para producir un lecho de vainas de café verde y un extracto;
someter el lecho de vainas de café verde a un solvente alcohólico a $75-78^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 7 a 8 horas tres veces para producir un extracto de lecho;
filtrar el extracto y el extracto de lecho para producir un extracto filtrado y
concentrar el extracto filtrado eliminando el solvente para producir un complejo de café verde;
5. disolver el complejo de café verde en un solvente y someter el complejo de café verde disuelto a extracción con resina polimérica de estirenodivinilbenceno, recogiendo así un complejo de café verde purificado sobre la resina;
eluir el extracto de café verde purificado de la resina con un solvente para producir un complejo de café verde puro soluble; y
producir un complejo de café verde puro concentrado eliminando el solvente del complejo de café verde puro soluble;
6. deshidratar por aspersión el complejo de café verde puro soluble concentrado para producir una composición de ácido clorogénico desecada.
7. La composición de la reivindicación 3, en donde la composición de ácidos clorogénicos es adecuada para tratar la obesidad en un sujeto.
8. La composición de la reivindicación 3, en donde se formula la composición de ácidos clorogénicos como un polvo, una píldora, una tableta, un gránulo, una cápsula, una película delgada, una solución, un espray, un jarabe, un antitusígeno, un trocisco, una pastilla, una goma de mascar, una pasta, un vapor, una suspensión, una emulsión, un ungüento, una crema, una loción, un linimento, un gel, una gota, un parche tópico, un parche bucal, una perla, una gominola, un gel, un sol o una inyección.

FIG. 1

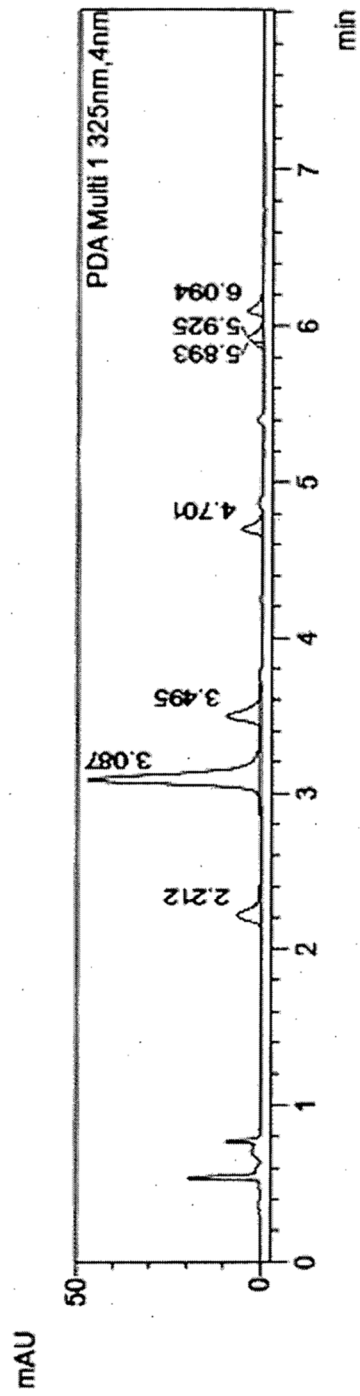


FIG. 2

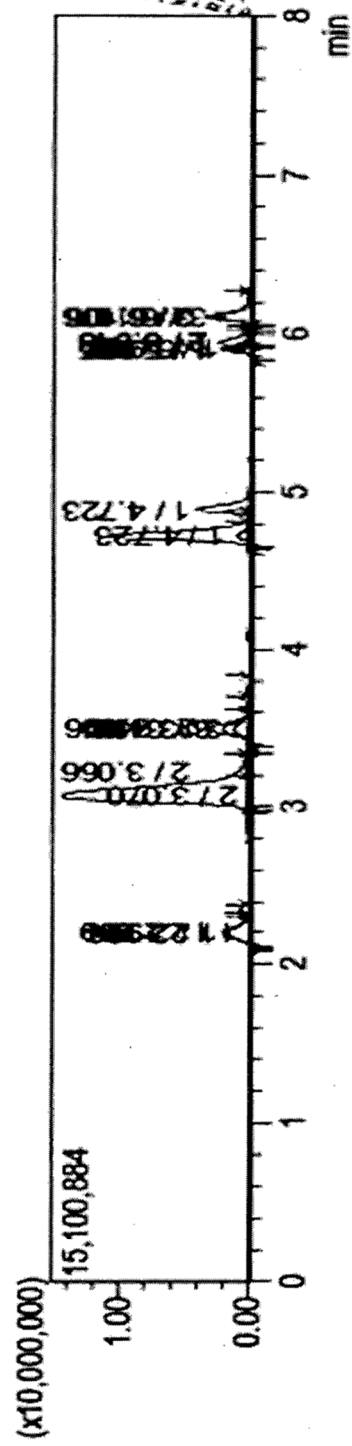


FIG. 3

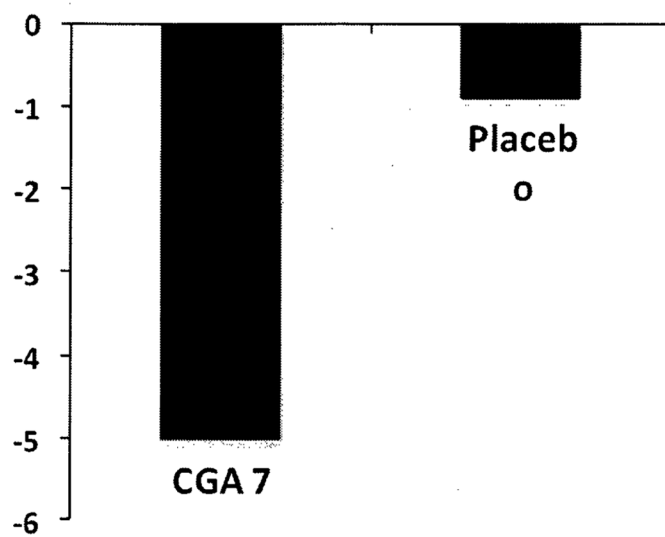


FIG. 4

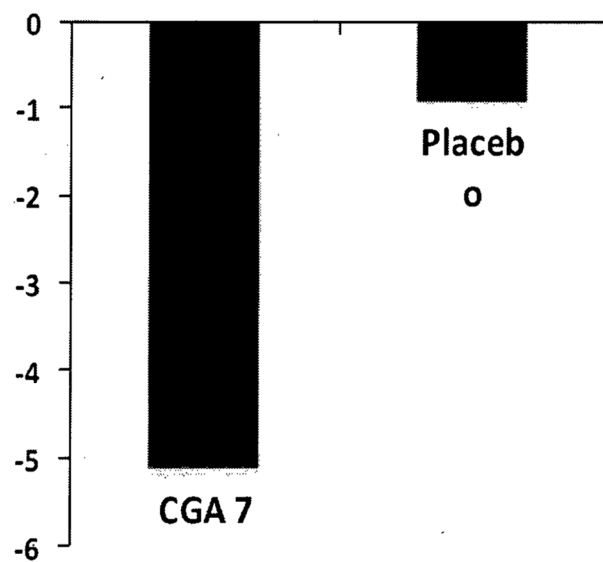


FIG. 5

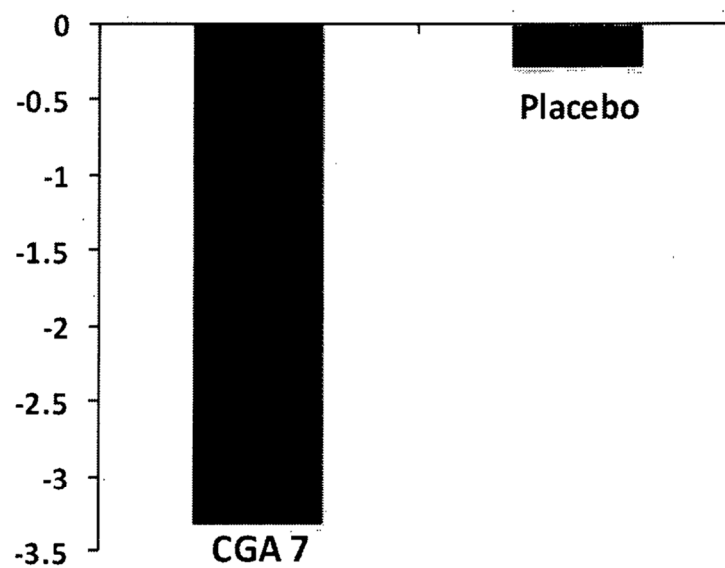


FIG. 6

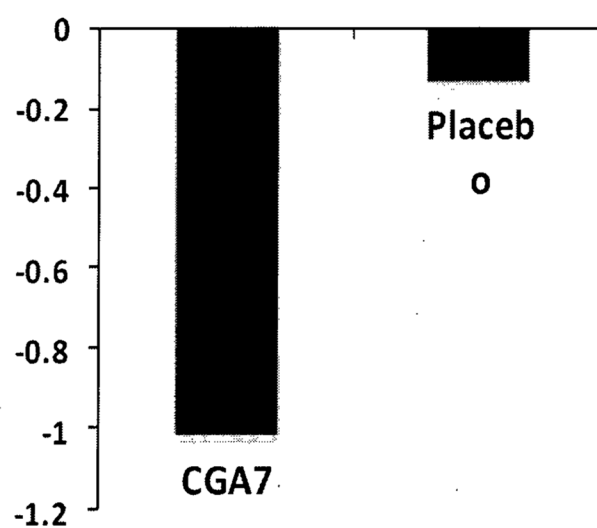


FIG. 7

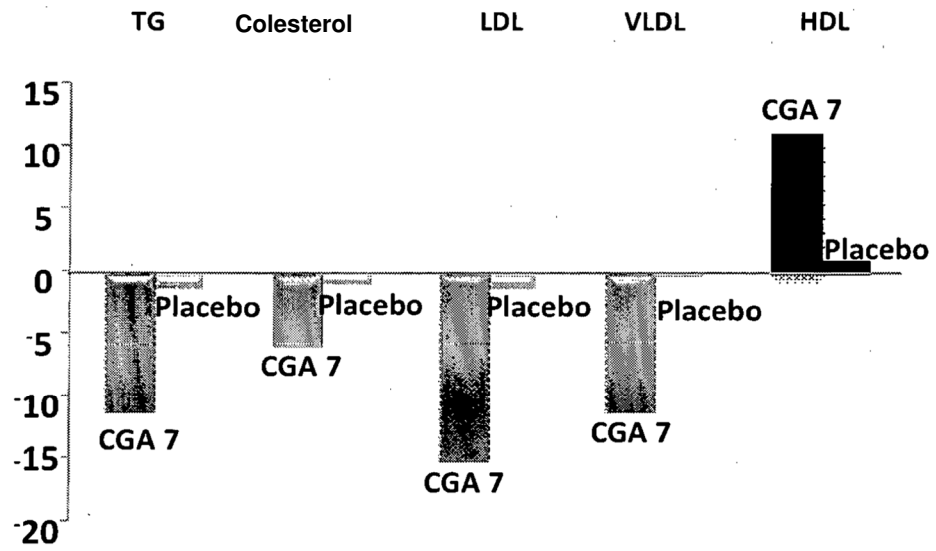


FIG. 8A

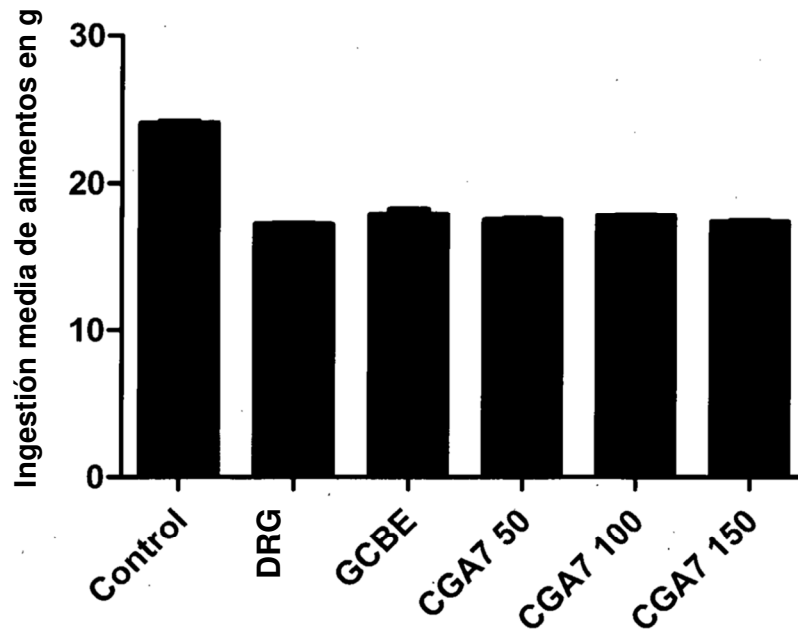


FIG. 8B

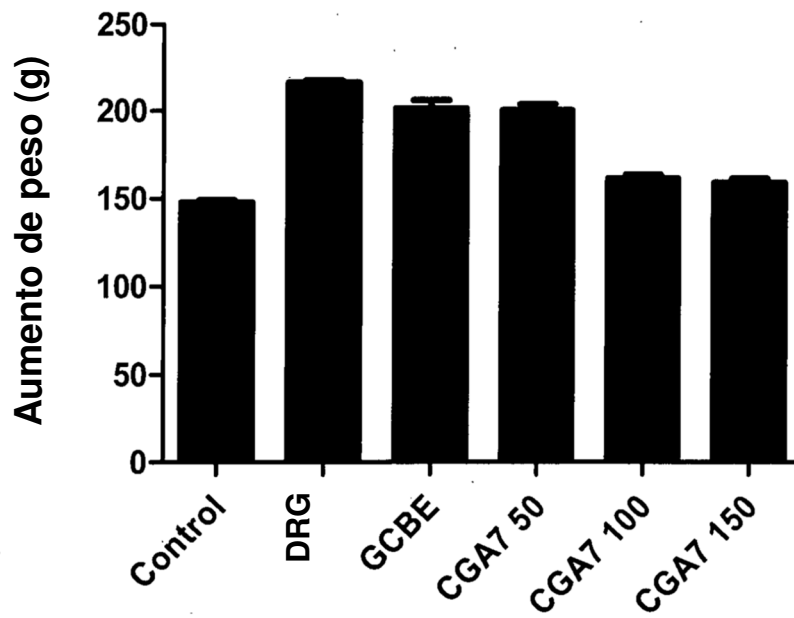


FIG. 9A

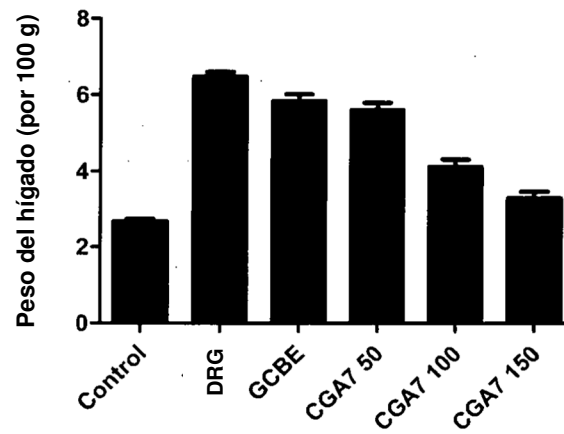


FIG. 9B

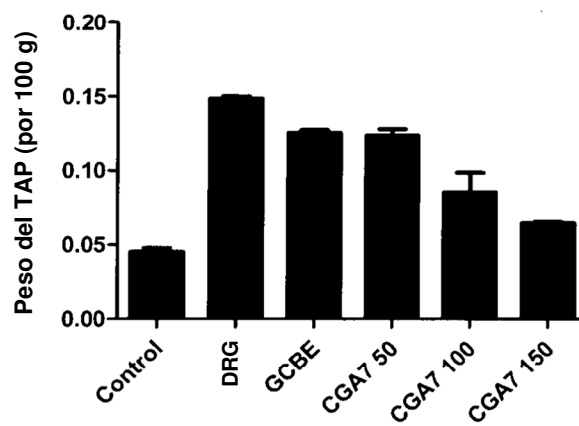


FIG. 9C

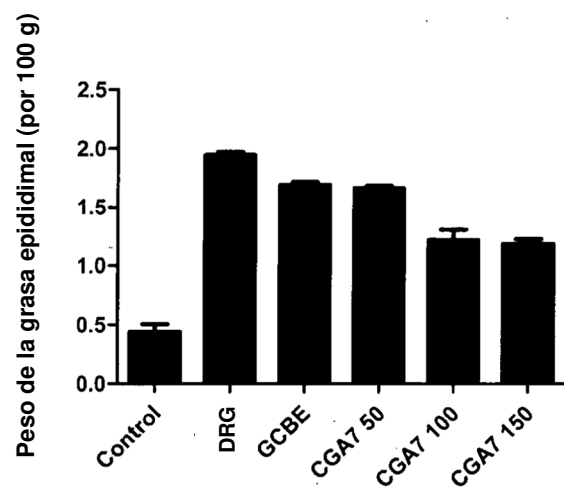


FIG. 9D

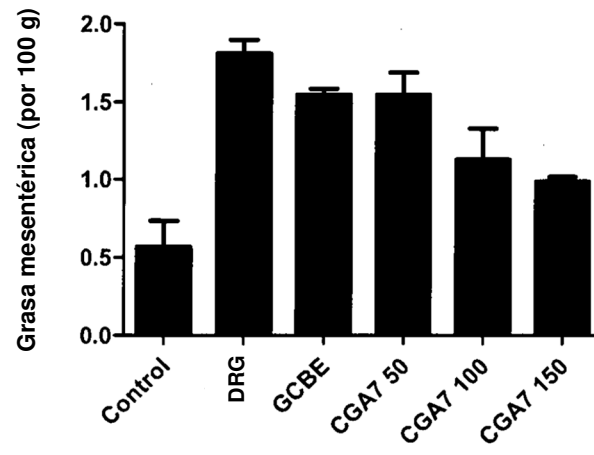


FIG. 9E

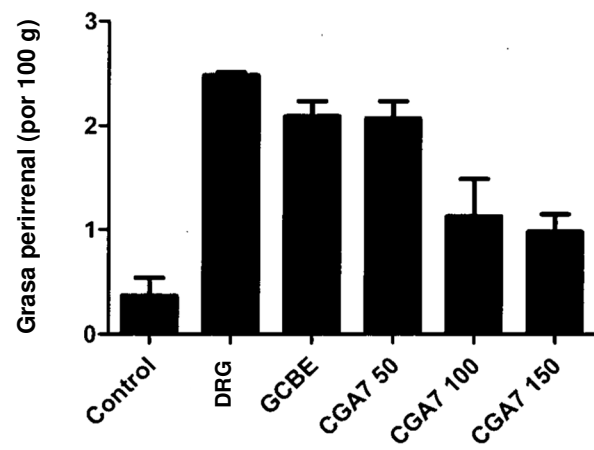


FIG. 10A

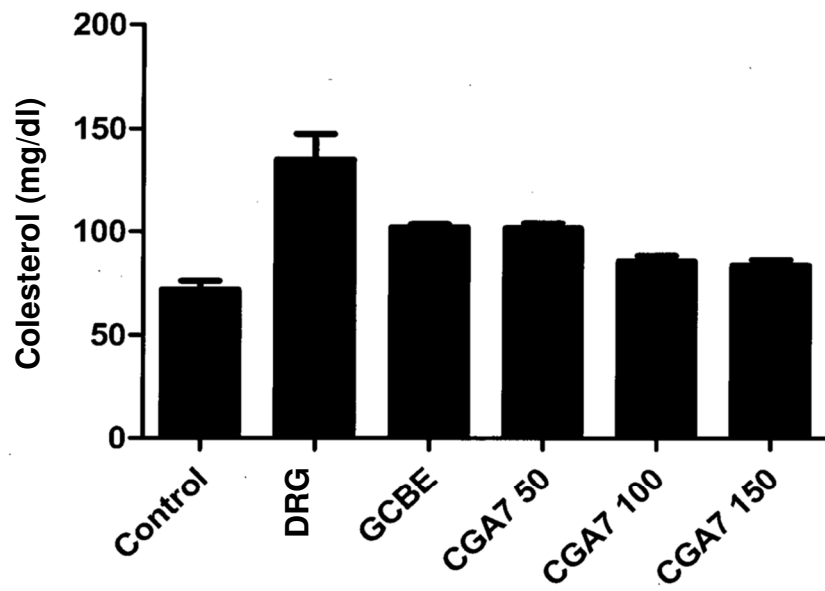


FIG. 10B

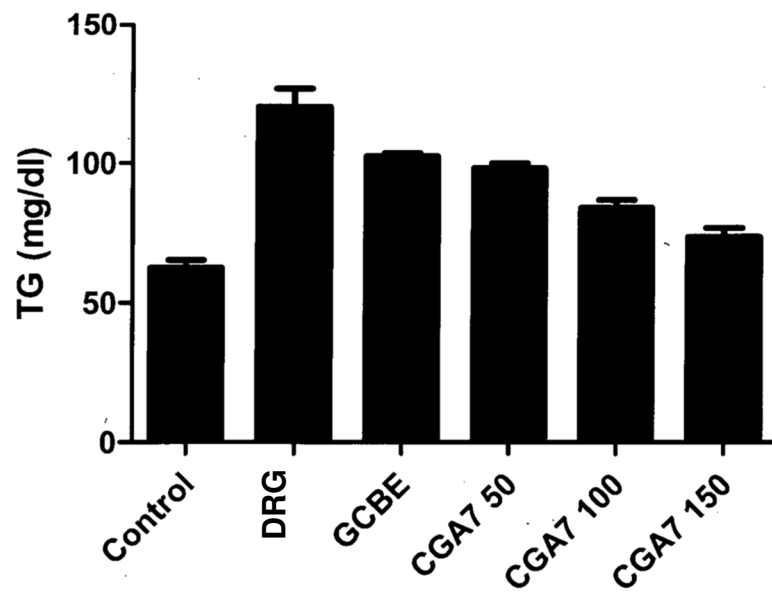


FIG. 10C

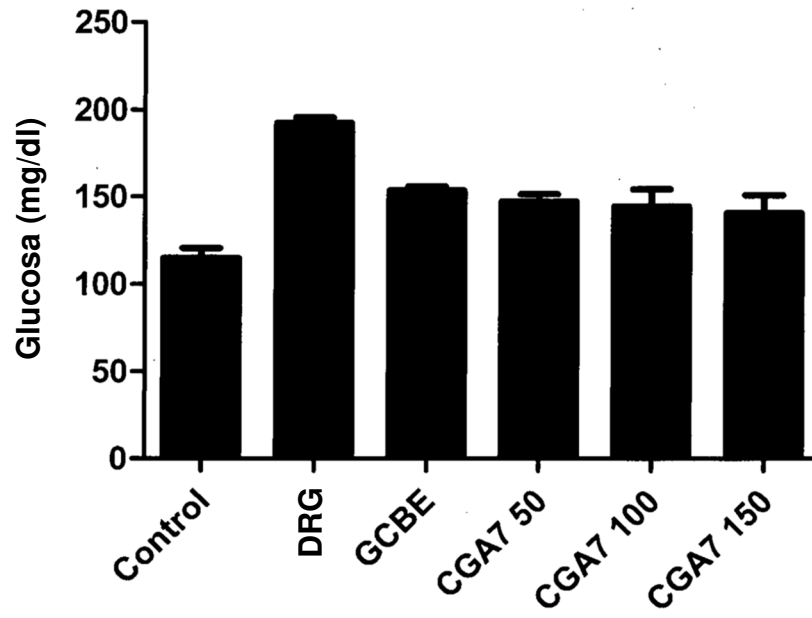


FIG. 10D

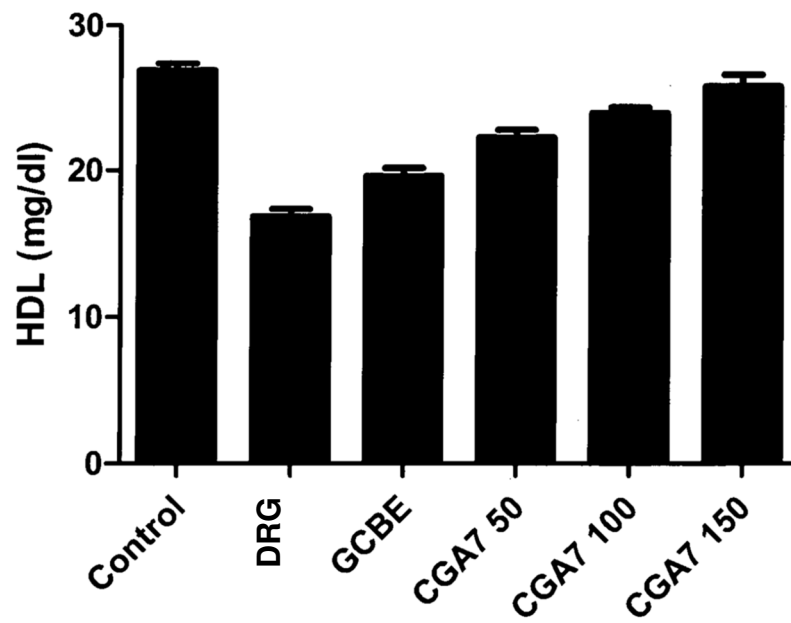


FIG. 11