



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 361 348**

⑫ Número de solicitud: 201031393

⑬ Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)	C12S 3/24 (2006.01)
A23J 3/04 (2006.01)	A23J 3/34 (2006.01)
A23J 1/04 (2006.01)	A23L 1/325 (2006.01)
A23L 1/333 (2006.01)	A61K 35/56 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)	A61P 37/00 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **17.09.2010**

⑯ Prioridad: **18.09.2009 FR 09 56421**

⑰ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2011**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2011

⑲ Solicitante/s: **LABORATOIRES LE STUM**
Parc Armon Océan
4 impasse de Kerhoas
F-56260 Larmor-Plage, FR

⑳ Inventor/es: **Le Stum, Raymond y**
Le Stum, Michel

㉑ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

㉒ Título: **Hidrolizado de animales marinos, procedimiento, obtención y utilización.**

㉓ Resumen:

Hidrolizado de animales marinos, procedimiento, obtención y utilización.

La presente invención se relaciona con un procedimiento de obtención de un hidrolizado de vísceras de animales marinos, con el hidrolizado susceptible de ser obtenido por este procedimiento y utilización del hidrolizado como medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario.

El hidrolizado susceptible de ser obtenido por el procedimiento de la presente invención permite particularmente frenar o detener los procesos de degeneración muscular, aumentar el desarrollo muscular, disminuir la masa grasa en beneficio de la masa seca, luchar contra patologías musculares, disminuir la absorción de nutrientes a nivel intestinal, reforzar el sistema inmunitario, aumentar la tasa de hemoglobina y/o de hematocrito, disminuir la celulitis, y/o aumentar la saciedad.

ES 2 361 348 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrolizado de animales marinos, procedimiento, obtención y utilización.

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con un procedimiento de obtención de un hidrolizado de coproductos de animales marinos, siendo el hidrolizado susceptible de ser obtenido por este procedimiento y la utilización del hidrolizado como medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario.

10

El hidrolizado susceptible de ser obtenido por el procedimiento de la presente invención permite particularmente frenar o detener los procesos de degeneración muscular, aumentar el desarrollo muscular, disminuir la masa grasa para aprovechar la masa seca, luchar contra patologías musculares, disminuir la absorción de nutrientes a nivel intestinal, reforzar el sistema inmunitario, aumentar la tasa de hemoglobina y/o de hematocrito, disminuir la celulitis, y/o

15

Estado de la técnica

Cada año, cerca de cientos de millones de toneladas de biomasa marina, entre los pescados, moluscos, crustáceos, etc., son explotados por el hombre alrededor del mundo. Es decir, solo menos de la mitad de esos recursos son directamente consumidos por el ser humano. Sería por lo tanto interesante poder valorizar la parte actualmente no utilizada de esos recursos, particularmente en la alimentación humana o animal.

20

A título de ejemplo, la sepia (*sepia officinalis*) es un cefalópodo cuyo crecimiento es extremadamente rápido y la duración de vida demasiado reducida.

25

Desde un punto de vista nutricional, la carne de la sepia tiene una relación proteína/lípidos muy elevada, un poco similar a la carne magra, lo que la hace en efecto un alimento interesante.

En Francia, la pesca de la sepia representó un poco menos de 15 mil toneladas en 2007. Estos cefalópodos son destinados principalmente a la exportación bajo forma pelada, eviscerada y congelada hacia los países mediterráneos y el Japón. La cantidad de coproductos provenientes de la transformación de los cefalópodos, como las pieles, las cabezas, las vísceras, los huesos o los cartílagos, corresponden a aproximadamente 30 o 40% del volumen de la sepia. Es por lo tanto interesante tratar de valorizar estos coproductos.

30

35

De manera general, los coproductos provenientes de la biomasa marina son generalmente dirigidos hacia la industria de alimentos para animales o la producción de aceites. La valorización de estos coproductos es un asunto de actualidad y numerosas formas de valorización quedan por explorar.

La utilización de extractos de coproductos de especies marinas que presentan complemento alimentario para post-larvas de crustáceos o juveniles de moluscos y de peces, muestran un muy fuerte potencial en la aceleración de su crecimiento y en el refuerzo de su sistema inmunitario.

40

El conjunto de estas investigaciones que llevan a moléculas bioactivas al seno de hidrolizados de coproductos de especies marinas muestra la presencia de moléculas con carácter de factor de crecimiento, regulador de la digestión e inmunomodulador, que tiene un importante papel que jugar en la acuicultura en los años por venir.

45

Paralelamente a los estudios que llevan en los extractos de estos coproductos de especies marinas, se han realizado investigaciones sobre los procedimientos de obtención de hidrolizados de los mismos.

50

Los procedimientos de obtención de hidrolizados de coproductos de especies marinas descritas hasta ahora no permiten obtener hidrolizados que sean utilizables para la nutrición humana.

En particular, los hidrolizados obtenidos por los procedimientos de la técnica anterior no son utilizables en nutrición humana puesto que no permiten una seguridad alimentaria suficiente para el ser humano. Además, los hidrolizados de la técnica anterior hacen llamado a sustancias no autorizadas o incluso están mal soportados por las personas que los consumen.

55

Por otro lado, los desacuerdos engendrados por la toma de hidrolizados de la técnica anterior no son compensados por un efecto valorizable en nutrición humana.

60

Existe por lo tanto una necesidad real de valorizar los coproductos de especies marinas, particularmente en nutrición humana, produciéndose la necesidad de poner a punto un procedimiento de obtención de un hidrolizado de estos productos que palien los defectos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, y permitan reducir los costos y procurar a los hidrolizados obtenidos uno o varios efectos valorizables.

65

Descripción de la invención

La presente invención tiene precisamente por meta resolver el conjunto de los problemas precitados, particularmente proveyendo un procedimiento de obtención de un hidrolizado de vísceras de animales marinos.

El procedimiento de la presente invención comprende las etapas siguientes:

- (a) mezcla de coproductos de animales marinos,
- (b) calentamiento de la mezcla obtenida en la etapa (a) a una temperatura que va de 30 a 65°C,
- (c) ajuste del pH de la mezcla obtenida en la etapa (b) a un valor que va de 1 a 8,
- (d) hidrolizado enzimático de la mezcla obtenida en la etapa (c) durante una duración que va de 1 a 8 horas,
- (e) calentamiento del hidrolizado obtenido en la etapa (d) a una temperatura que va de 75 a 150°C, y
- (f) enfriamiento del hidrolizado obtenido.

Se entiende por “animales marinos”, cualquier tipo de animales vivientes en medio acuático. Por ejemplo, los animales marinos pueden ser animales bénticos o pelágicos. Por ejemplo los animales bénticos son peces. A título de ejemplo de peces, pueden ser citados las anchoas, sardinas, bacalao, tiburones, caballa, atún. Los animales pelágicos pueden ser, por ejemplo, moluscos o crustáceos. Los moluscos pueden ser, por ejemplo, cefalópodos. Los cefalópodos pueden, por ejemplo, ser calamares, sepias o pulpos. Las gambas, cangrejos, langostas pueden ser citadas a título de ejemplo de crustáceos.

Se entiende por “coproductos”, una parte o el conjunto de subproductos de animales marinos. Se trata generalmente del conjunto de partes de animales marinos que no son en general utilizados en nutrición humana, por ejemplo, cabezas, ojos, pieles, vísceras de estos animales.

Se entiende por “mezcla de coproductos de animales marinos”, una mezcla de uno o varios animales marinos, idénticos o diferentes.

Se entiende por “hidrólisis enzimática”, una reacción catalizada por una o varias enzimas que actúan en la escisión de un compuesto proveniente de uno o varios coproductos de animales marinos en presencia de una molécula de agua.

Los compuestos pueden ser, por ejemplo, una proteína, un glúcido, un lípido, una glicoproteína, un glicolípido, un fosfolípido, un glicerofosfolípido, un ácido graso, un polipéptido, un péptido, o cualquier otra molécula biológica o química que se encuentran en los dichos coproductos.

Las enzimas pueden ser hidrolasas, por ejemplo esterasas, peptidasas, oxidasas, lipasas o una combinación de éstas. Por ejemplo, las enzimas pueden ser escogidas en el grupo que comprende la aminopeptidasa, la betaglucosidasa, carboxipeptidasa, colesterol estearasa, amilasa, proteasa, quimotripsina, desoxirribonucleasa, lipasa, lisozima, maltasa, fosfatasa alcalina, fosfolipasa, ribonucleasa, tripsina, alcalasa, lipaina, o una combinación de éstas.

Las enzimas pueden, por ejemplo, ser enzimas endógenas, enzimas exógenas o las dos. Cuando en la hidrólisis enzimática intervienen enzimas endógenas únicamente, se habla entonces “de autólisis”. Las enzimas endógenas provienen de los coproductos de animales marinos utilizados como sustrato en el procedimiento de la presente invención.

Se entiende por “hidrolizado”, el o los productos provenientes de la etapa (d) de la hidrólisis enzimática.

Ventajosamente, la etapa (a) del procedimiento de la presente invención conduce a suministrar una mezcla homogénea. Preferiblemente, la mezcla se efectuó durante una duración que va de 5 a 30 minutos.

La etapa (a) puede comprender además una etapa de trituración de vísceras. Esta etapa complementaria puede intervenir por ejemplo cuando los coproductos de animales marinos son sólidos, en espuma o aportados bajo forma congelada.

La homogenización de la mezcla tiene por objetivo permitir que la etapa (b) de calentamiento y la etapa (c) de ajuste del pH sean igualmente homogéneas.

La etapa (a) puede comprender además una etapa de dilución de la mezcla de vísceras de animales marinos en el agua. El agua puede, por ejemplo, ser aportada a una temperatura que va de 30 a 65°C, por ejemplo, de 40 a 60°C.

El calentamiento de la mezcla obtenida en la etapa (a), puede ser realizada a una temperatura que va de 40 a 60°C, por ejemplo a 55°C.

ES 2 361 348 A1

Según una alternativa del procedimiento de la presente invención, la temperatura de las mezclas obtenidas en las etapas (b) y (c) puede ser mantenida a una temperatura fija que va de 30 a 65°C, por ejemplo de 40 a 60°C, por ejemplo a 55°C. Según otra alternativa, esta temperatura puede variar permaneciendo en una gama que va de 30 a 65°C.

5 La mezcla obtenida en la etapa (b) puede, por ejemplo, ser ajustada a un valor comprendido que va de 2 a 6, por ejemplo, a un valor que va de 3 a 4, por ejemplo, a un valor de 3. Por ejemplo, el pH puede ser ajustado con la ayuda de ácido fosfórico, de ácido láctico o una de sus sales, de ácido málico o una de sus sales, de ácido cítrico o una de sus sales, de ácido acético, de ácido clorhídrico, o una combinación de éstos. Por ejemplo, el pH puede ser mantenido a un valor que va de 1 a 8, por ejemplo de 2 a 6, por ejemplo de 3 a 4, por ejemplo a 3, en el transcurso de una, 10 varias o todas las etapas del procedimiento de la presente invención sucesivas a la etapa (b).

La etapa (d) de hidrólisis enzimática del procedimiento de la presente invención, puede ser realizada durante una duración que va de 2 a 6 horas, por ejemplo, de 3 a 5 horas, por ejemplo de 3 horas.

15 La etapa (e) de calentamiento puede ser realizada a una temperatura que va de 80 a 125°C, por ejemplo, de 85 a 110°C, por ejemplo a 90°C. Esta etapa puede ser realizada durante una duración que va de 5 minutos a dos horas, por ejemplo, de 10 a 30 minutos, por ejemplo de 15 minutos. Por ejemplo, la etapa (e) de calentamiento puede ser realizada a una temperatura de 90°C durante 15 minutos. Al final de esta etapa, se obtiene ventajosamente un hidrolizado en el cual todo o parte de las enzimas son inactivadas. Ventajosamente, el porcentaje de enzimas inactivadas en el transcurso de esta etapa puede, por ejemplo, ser superior a 90%, por ejemplo, superior a 95%, por ejemplo a 99%, por ejemplo, superior a 99.9%. Además, esta etapa de calentamiento permite asegurar una cierta seguridad frente a los riesgos 20 microbiológicos y parasitarios.

El procedimiento de la presente invención puede comprender, además, una etapa de recubrimiento/gelación del hidrolizado obtenido en la etapa (e) con polisacáridos. Por ejemplo, los polisacáridos son escogidos dentro del grupo que comprende los dextranos, la agarosa, la agaropéptina, los alginatos, los carragenanos, las peptinas o una combinación de éstos. 25

El recubrimiento puede, por ejemplo, ser realizado con una cantidad de polisacáridos comprendido entre 1 y 10% en peso con respecto al hidrolizado obtenido en la etapa (e), por ejemplo 5% en peso. 30

Además, el procedimiento de la presente invención puede comprender una etapa de tamizado en caliente. Esta etapa puede, por ejemplo, ser realizada a una temperatura que va de 40 a 60°C, por ejemplo a una temperatura de 55°C. El tamiz utilizado puede ser estático o vibrante. El umbral de detención del tamiz puede ir de 10 a 750 micrones, por ejemplo de 25 a 200 micrones, por ejemplo el umbral retenido puede ser de 100 micrones. 35

El procedimiento de la presente invención puede, además, comprender una etapa (g) de secado, sucesiva a la etapa (f).

40 Ventajosamente, el secado se realiza a una temperatura que va de 35 a 75°C, por ejemplo de 40 a 60°C, por ejemplo a una temperatura de 50°C. La etapa (g) de secado puede, por ejemplo, ser realizada bajo vacío.

Se entiende por “secado bajo vacío”, un secado realizado en un medio en donde la presión es inferior a la presión atmosférica. 45

El procedimiento de la presente invención puede igualmente comprender una etapa (h) de trituración del hidrolizado obtenido en la etapa (g).

50 El hidrolizado obtenido por el procedimiento de la presente invención puede ser condicionado bajo diferentes formas bien conocidas del experto en la técnica. Por ejemplo, puede estar condicionado bajo forma de saquito, de comprimido, de cápsula, gragea, píldora, ampolla, gel, bebida, dulce, goma de mascar, granulados, pastillas, polvo, supositorio, óvulo, suspensiones y emulsiones bebibles, cataplasma, crema, pomada o jarabe.

55 La presente invención tiene igualmente por objeto un hidrolizado proveniente de coproductos de animales marinos, particularmente un hidrolizado susceptible de ser obtenido por el procedimiento de la presente invención.

El hidrolizado de la presente invención comprende una composición particular de lípidos, proteínas o aminoácidos, glúcidos, minerales, vitaminas.

60 El porcentaje de lípidos en el hidrolizado de la presente invención puede por ejemplo, ir de 5 a 10% en peso de hidrolizado, por ejemplo entre 6 y 8%, por ejemplo, 7%. Los lípidos son por ejemplo, ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos poliinsaturados, o una combinación de éstos. Por ejemplo, los ácidos grasos pueden ser omega 3 (OM3) o de omega 6 (OM6). Por ejemplo, los OM3 son el ácido eicosapentanoico (EPA) o el ácido docohexanoico (DHA). Por ejemplo, el porcentaje de OM3 puede ir de 20 a 35% en peso de lípidos, por ejemplo de 25 a 32%; por ejemplo el porcentaje es de 30% en peso de lípidos, la relación OM3/OM6 puede ir de 1 a 10, por ejemplo de 2 a 8, por ejemplo, la relación OM3/OM6 puede ser de 5. El porcentaje de fosfolípidos puede ir, por 65 ejemplo, de 1 a 5% en peso del hidrolizado, por ejemplo, 3% en peso.

ES 2 361 348 A1

El porcentaje en proteínas o de aminoácidos puede ir de 50 a 80% en peso del hidrolizado, por ejemplo, de 65 a 70%, por ejemplo 70%. Los aminoácidos pueden, por ejemplo, ser alanina, arginina, aspargina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutamina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, pirrolicina, selenocisteína, serina, taurina, treonina, tirocina, valina. Por ejemplo, el porcentaje de falina puede ir de 1 a 3% en peso de proteínas o de aminoácidos, por ejemplo de 1,5 a 2,5%, por ejemplo 1,9%. Por ejemplo, el porcentaje de isoleucina puede ir de 1 a 3% en peso de proteínas o de aminoácidos, por ejemplo de 1,5 a 2%, por ejemplo 1,7. Por ejemplo, el porcentaje de leucina puede ir de 1,5 a 4% en peso de proteínas o de aminoácidos, por ejemplo de 2,5 a 3%, por ejemplo 2,7%. Por ejemplo, el porcentaje de taurina puede ir de 1,3 a 3,5% en peso de proteínas o de aminoácidos, por ejemplo de 2 a 2,7%, por ejemplo, 2,3%.

El hidrolizado de la presente invención puede comprender entre 50 y 80% en peso de proteínas en donde el peso molecular es inferior a 4,4 kDa, por ejemplo 70%.

El porcentaje de glúcidos puede ser inferior a 1% en peso del hidrolizado, por ejemplo, inferior al 0,5%, por ejemplo, inferior a 0,2%.

Los minerales pueden ser, por ejemplo, fósforo, sodio, potasio, calcio, cobre, hierro, magnesio, yodo, manganeso, selenio, zinc, o una combinación de éstos. Por ejemplo, el porcentaje de fósforo puede ir de 2 a 8% en peso del hidrolizado, por ejemplo de 3 a 6%, por ejemplo 4,8%. Por ejemplo, el porcentaje de cobre puede ir de 0,001 a 0,1% en peso del hidrolizado, por ejemplo de 0,05 a 0,05%, por ejemplo 0,01%. Por ejemplo, el porcentaje de magnesio puede ir de 0,1 a 1,5% en peso del hidrolizado, por ejemplo de 0,4 a 1%, por ejemplo 0,8%. Por ejemplo, la cantidad de selenio puede ir de 250 a 800 µg por 100 gramos de hidrolizado, por ejemplo de 300 a 500 µg, por ejemplo 400 µg.

Las vitaminas pueden ser la vitamina A, B3, B5, B6, B12, D, E, PP, o una combinación de éstas. Por ejemplo, la cantidad de vitamina B12 puede ir de 5 a 50 µg por 100 gramos de hidrolizado, por ejemplo de 7 a 20 µg, por ejemplo 10 µg.

El hidrolizado según la presente invención es digerible y tolerable por el ser humano y los animales.

Los inventores han puesto en evidencia que el hidrolizado según la presente invención presenta, de manera inesperada, un gran número de propiedades que son particularmente las siguientes.

El hidrolizado según la presente invención puede permitir, por ejemplo, frenar o detener los procesos de degeneración muscular, aumentar el desarrollo muscular, disminuir la masa grasa en beneficio de la masa seca, luchar contra patologías musculares, mejorar la absorción de nutrientes a nivel intestinal, reforzar el sistema inmunitario, aumentar la tasa de hemoglobina y/o de hematocrito, disminuir la celulitis, y/o aumentar la saciedad.

Así la presente invención tiene igualmente por objeto la utilización del hidrolizado de la presente invención como medicamento, alimento, aditivo o complemento alimentario o cualquier otra forma de administración conocida del experto en la técnica para el empleo de los efectos precitados.

El medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario puede, por ejemplo, ser utilizado en nutrición humana o animal.

El medicamento, el alimento o el aditivo o complemento alimentario según la presente invención, puede ser utilizado también por las personas que desean “reesculpir” sus cuerpos, es decir desfavorecer la masa grasa en beneficio de la masa magra, para las personas que buscan un soporte nutricional durante los desempeños físicos. El medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario según la presente invención puede ventajosamente ser utilizado por personas deseosas de retomar una actividad deportiva.

Se entiende por “masa magra”, el peso constituido por el conjunto de los músculos, órganos y vísceras de un organismo.

Se entiende por “masa grasa”, el peso constituido por el conjunto de reservas de grasa de un organismo.

Por otro lado, el medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario según la presente invención puede ventajosamente ser utilizado para disminuir significativamente el contorno de medidas y el contorno de caderas de sus usuarios. La utilización del medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario según la presente invención permite además limitar el almacenamiento de grasas en los tejidos adiposos y/o no favorecer su almacenamiento. Por ejemplo, el medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario según la presente invención puede ser utilizado para reducir la celulitis.

Ventajosamente, el medicamento, alimento o la composición según la presente invención puede ser utilizado para aumentar el desarrollo muscular.

Además, el medicamento, el alimento o aditivo o complemento alimentario según la presente invención puede ser utilizado para luchar contra las patologías musculares. Por ejemplo las patologías musculares pueden ser las miopatías, por ejemplo, las distrofias musculares progresivas, las distrofias musculares congénitas, las miopatías congénitas, las

enfermedades musculares miotónicas, las miopatías metabólicas, los dermatomiocitos, los síndromes miotónicos, las miolisis o las fibromialgias.

Además, el medicamento, el alimento o el aditivo o complemento alimentario según la presente invención puede ser utilizado para frenar o detener los procesos de degeneración muscular, particularmente los procesos de degeneración muscular ligadas a la edad, por ejemplo, la sarcopenia.

De manera inesperada, los inventores han podido constatar que la utilización del medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario según la presente invención permite favorecer la oxigenación muscular. El aumento de la oxigenación muscular es particularmente debido a un aumento del volumen de los glóbulos rojos en la sangre, que se traducen por un aumento de la tasa de hemoglobina y de hematocrito.

El medicamento, el alimento o el aditivo o complemento alimentario según la presente invención es notable porque puede ser utilizado para reforzar el sistema inmunitario. Por ejemplo, el medicamento, alimento o aditivo o complemento según la presente invención puede ser utilizado para aumentar el número de linfocitos o el volumen de placas de Peyer.

Por otro lado, el medicamento, el alimento o el aditivo o complemento alimentario según la presente invención igualmente puede ser utilizado para mejorar la absorción de los nutrientes a nivel intestinal.

Adicionalmente, el medicamento, el alimento o aditivo o complemento alimentario según la presente invención puede ser utilizado para aumentar la saciedad. Por consiguiente el consumidor está menos inclinado a picar entre comidas, permitiendo así mantener el peso perdido.

Otras ventajas podrán incluso ser evidentes para el experto en la técnica con la lectura de los ejemplos de más abajo, ilustrados por las figuras anexas, dadas a título ilustrativo.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa la impronta peptídica de un extracto de hidrolizado según la presente invención (extracto 1), analizado por espectrometría de masas en una gama de 0 a 80.000 Daltons (Da) en modo lineal. El eje de las abscisas representa la masa sobre la carga ("m/z" o Dalton por coulomb). El eje de las ordenadas representa la intensidad medida en unidad arbitraria (a.u.).

- La figura 2 representa la impronta peptídica de un extracto de hidrolizado según la presente invención (extracto 1), analizado por espectrometría de masas en una gama de 500 a 3200 Daltons (Da) en modo reflectrón. El eje de las abscisas representa la masa sobre carga ("m/z" o Dalton por coulomb). El eje de las ordenadas representa la intensidad medida en unidad arbitraria (a.u.).

- La figura 3 representa la impronta peptídica de un extracto de hidrolizado según la presente invención (extracto 2), analizado por espectrometría de masas en una gama de 500 a 4500 Daltons (Da) en modo reflectrón. El eje de las abscisas representa la masa sobre carga ("m/z" o Dalton por coulomb). El eje de las ordenadas representa la intensidad medida en unidad arbitraria (a.u.).

- Las figuras 4A, 4B y 4C representan fotografías realizadas con microscopio óptico del contenido en vacuolas lipídicas de células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos y puestas en presencia de:

- TNF alfa en concentraciones respectivas (de la izquierda hacia la derecha) de 0 nM, 5 nM y 50 nM,

- hidrolizados H0bis, H161, H162, H163, H301, H302 y H303 en concentraciones respectivas (de la izquierda hacia la derecha) de 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml, y 250 µg/ml.

- La figura 5 representa fotografías realizadas con microscopio óptico de células musculares C2C12 inducida para ser diferenciadas en miotubos en presencia de:

- testosterona (Testo.) en concentraciones respectivas (de la izquierda hacia la derecha) de 0 nM, 10 nM y 1000 nM.

- hidrolizados H0bis, H162, H163, H601 y H602 en concentraciones respectivas de la (izquierda hacia la derecha) de 0,5 µg/ml, 5 µg/ml y 50 µg/ml.

Ejemplos

En estos ejemplos, el Tris (trishidroximetilaminoetano o 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) provienen de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), las células 3T3-L1 y C2C12 provienen de ATCC (Manassas, USA).

Ejemplo 1

Empleo de un procedimiento de obtención de un hidrolizado de vísceras de sepias

5 Ejemplos de realización A

Se colocan 250 kilogramos de vísceras de sepias frescas en un reactor termostataado con doble pared de agitador de palas. Allí se ajusta a un volumen de agua a 65°C, luego se homogeniza la mezcla durante 10 minutos. Se lleva la temperatura de mezcla a 55°C luego se ajusta el pH de ésta a 6, con la ayuda de ácido fosfórico a 75%. La incubación se desarrolla bajo agitación, a 55°C durante 2 horas luego se ajusta la alcalasa 2,4 L a razón de una relación enzima/sustrato de 1,5%. La hidrólisis se continúa durante 1 hora luego la mezcla se lleva a una temperatura de 90°C. Se realiza una meseta técnica de 15 minutos a esta temperatura luego el hidrolizado se tamiza sobre filtros 100 µm, se seca bajo vacío en estufa y triturado hasta a 300 µm con la ayuda de un triturador a vis.

15 Ejemplo de realización B

Se procede a la trituración de 250 kilogramos de vísceras de sepias congeladas a fin de obtener pedazos de 1 cm. La trituración se introduce en un reactor termostataado con doble pared y agitador de palas. Este se ajusta a un volumen de agua a 65°C, luego se homogeniza la mezcla durante 10 minutos. Se eleva la temperatura de la mezcla a 55°C. La incubación se desarrolla bajo agitación, a 55°C durante 3 días. La mezcla es a continuación elevada a una temperatura de 90°C. Se realiza una meseta técnica de 15 minutos a esta temperatura luego se añaden 7,5 kg de alginatos en el reactor. La mezcla se homogeniza durante 20 minutos luego el hidrolizado se tamiza sobre filtro 100 µm, se seca bajo vacío en estufa y se tritura hasta 300 µm con la ayuda de un triturador.

25 La tabla 1 de más abajo presenta características del procedimiento de obtención del hidrolizado susceptible de ser obtenido por el procedimiento de la presente invención.

30 TABLA 1

Ejemplos de hidrolizado susceptibles de ser obtenidos por el procedimiento de la presente invención

No. muestra	Tipo de hidrólisis	pH	Duración	Volumen de agua	Enzima
H 161	Autólisis	3	3h	1	-
H 162	Autólisis	3	3h	1	-
H 163	Autólisis	3	4h	1	-
H 301	Hidrólisis	6	3h	1	lipaina
H 302	Hidrólisis	6	3h	1	lipaina
H 303	Hidrólisis	6	4h	1	lipaina
H 39	Autólisis tras Hidrólisis	6	2h+1h	1	alcalasa
H 52	Hidrólisis	6	3h	1	lipaina
H 53	Hidrólisis	3	3h+ 2h	1	lipaina

ES 2 361 348 A1

	luego Autólisis				
H 57	Hidrólisis luego Autólisis	3	3h+ 2h	2	alcalasa
H 58	Hidrólisis	6	3h	2	alcalasa
H 601	Hidrólisis	6	3h	2	lipaina
H 602	Hidrólisis	6	4h	2	lipaina
H 61	Hidrólisis luego Autólisis	3	3h+ 2h	2	lipaina
H 63	Autólisis	3	3 días	1	-

En esta tabla “H” significa “hidrolizado”.

El volumen de agua se expresa en volumen de agua con respecto al volumen de materia prima. Por ejemplo, el valor “1” significa que se agrega un volumen de agua por un volumen de coproductos. El valor “2” significa que se agregan dos volúmenes de agua por un volumen de coproductos.

Ejemplo 2

Ejemplo de un hidrolizado obtenido por el procedimiento de la presente invención

La tabla 2 de más abajo presenta un ejemplo de la composición de hidrolizado obtenido por el procedimiento de la presente invención.

En esta tabla, el porcentaje es un porcentaje en peso del compuesto en el hidrolizado.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 361 348 A1

TABLA 2

Ejemplo de un hidrolizado obtenido por el procedimiento de la presente invención

	Compuestos	Cantidad presentada en el hidrolizado
LÍPIDOS	Totales	7,3%
	Fosfolípidos	2,3%
	Saturados	2,39%
	Monoinsaturados	2,11%
	Poliinsaturados	2,81%
	EPA	0,84%
	DHA	0,99%
	Total OM3	2,56%
	Total OM6	0,45%
	Colesterol total	0,04%
PROTEINAS AMINOÁCIDOS	Total	69,7%
	Triptófano	0,41%
	Taurina	2,29%
	Ácido aspártico	3,59%
	Treonina	1,86%
	Serina	1,66%
	Ácido Glutámico	4,78%
	Prolina	1,63%
	Glicina	2,11%
	Alanina	2,04%
	Cisteína	0,55%
	Valina	1,90%
	Metionina	0,86%
	Isoleucina	1,74%
	Leucina	2,73%
	Tirosina	1,19%
	Fenilalanina	1,55%
	Histidina	0,86%
	Lisina	2,49%
	Arginina	1,84%
GLÚCIDOS	Totales	< 0,2%

ES 2 361 348 A1

MINERALES	Fósforo	4,77%
	Sodio	1,91%
	Potasio	0,76%
	Calcio	1,02%
	Cobre	0,0126%
	Hierro	0,0092%
	Magnesio	0,81%
	Yodo	< 10 mg/kg
	Manganeso	0,0005%
	Selenio	397 µg /100
	Zinc	0,012%
VITAMINAS	Vit E	0,00235%
	Vit B3	0,00342 %
	Vit B5	0,00099%
	Vit B6	0,00012%
	Vit B12	10,4 µg /100g
CONTAMINANTES	HAP	< 1 µg/kg
	Dioxinas	<2 mg/kg
	Plomo	<0,6 mg/kg
	Ácido domoico	< 0,3 mg/kg
	Mercurio	<0,2 mg/kg
VALOR ENERGÉTICO	-	346 Kcal / 100g

Ejemplo 3

Caracterización de un hidrolizado peptídico por espectrometría de masas

1- Preparación de las muestras

Un hidrolizado según la presente invención se presenta bajo forma de polvo para ser probado.

Un primer extracto (extracto 1) se realiza de la siguiente manera. Se mezcla una muestra de 100 mg de hidrolizado según la presente invención con 1 mL de Tris a 20 mmol/L a pH 7,4. La mezcla enseguida se incuba 1 hora a 4°C bajo agitación, luego se centrifuga 20 minutos a 4°C a 15.000 g (ultracentrifugeuse J2-21 Beckman Coulter, Roissy, France) luego 1 hora a 4°C a 105000 g (ultracentrifugeuse Sorvall OTD50B, DuPont, Les Ulis, France). Se realiza una dosis BCA. La concentración en proteína medida es de 5 µg/mL, que corresponde a una extracción de 2,25 mg de proteínas.

Una serie de otros extractos se prepara de la siguiente manera. Se mezclan respectivamente muestras de 10, 20, 50 y 100 mg de hidrolizado según la presente invención con 1 mL de agua milliQ (agua ultra pura). Se realizan 4 ciclos de congelación a -80°C y de descongelación. La mezcla enseguida se centrifuga 20 minutos a 4°C a 15000 g (ultracentrifugeuse J2-21 Beckman Coulter, Roissy, France) luego 1 hora a 4°C a 105000 g (ultracentrifugeuse Sorvall OTD50B DuPont, Les Ulis France). Una dosis BCA se realiza. Las concentraciones en proteína medidas van de 0,9 a 6,1 µg/mL, y corresponden a una extracción de 0,72 mg, 1,6 mg, 3,6 mg y 4,8 mg de proteínas respectivamente para

ES 2 361 348 A1

10, 20, 50 y 100 mg de muestras. El extracto corresponde al extracto obtenido en parte de 50 mg de hidrolizado para el cual una concentración de 4,5 µg/mL de proteína ha sido medida.

2- *Análisis por espectrometría de masas*

Los extractos 1 y 2 se depositan distintamente por microdesalados y se depositan manualmente sobre cible MTP Anchor 600/384 S/N 11188 en presencia de la matriz HCCA (ácido alfa-Ciano-4-hidroxicinámico).

El análisis por espectrometría de masas se realiza sobre MALDITOF/TOF (Ultraflex, Bruker Daltonics, Leipzig, Allemagne). La adquisición y la explotación de impresiones peptídicas se realizan vía la suite logicielle FlexControl (marca comercial) y FlexAnalysis (marca comercial) de Bruker Daltonics. La calibración de los espectros se efectúa a partir de los calibrantes: Péptido calibración Estándar (#206195, Bruker Daltonics).

Las impresiones peptídicas de los extractos 1 y 2 son representadas por las figuras 1 a 3.

El análisis por espectrometría de masas sobre una larga gama de masa (por ejemplo; 0-80000 Da, ver figura 1) permite revelar la presencia de entidades peptídicas repartidas exclusivamente sobre una gama 1000-4000 Da. Un análisis más detallado en modo reflectrón (alta resolución) sobre la gama 0-4500 Da permite afinar la distribución en las masas 500 a 3200 Da (ver figura 2).

La impresión peptídica es particularmente difícil de obtener, el espectro resultante tiende a mostrar la presencia de una mezcla muy compleja de péptidos.

El análisis del extracto 2 por impresión peptídica conduce a un resultado similar del análisis del extracto 1. El espectro siempre es complejo.

3- *Preparación de una nueva muestra*

Un nuevo extracto (extracto 3) se realiza de la manera siguiente. Se mezcla una muestra de 20 mg de hidrolizado según la presente invención con 950 µL de agua milliQ. Se realizan cinco ciclos de congelación en nitrógeno líquido durante dos minutos por ciclo y de descongelación al baño maría a 37°C durante 5 minutos por ciclo. La mezcla es a continuación centrifugada 20 minutos a 4°C a 15000 g (ultracentrifugadora J2-21, Beckman Coulter, Roissy, France) luego 1 hora a 4°C a 105000 g (ultracentrifugadora Sorvall OTD50B, DuPont, Les Ulis, France). Se realiza una dosis BCA se realiza. La concentración en proteína medida es de 2 µg/ml, que corresponde a una extracción de 1,19 mg de proteínas.

El rendimiento de la extracción es similar al obtenido por los ciclos de congelación/descongelación -80°C/20°C.

Los siguientes análisis se realizan a partir del extracto 3.

4- *Análisis por nanoLC-MS/MS*

Se analizan 5 y 100 pmoles del extracto 3 sobre gradiente de 75 minutos por espectrometría de masas sobre sistema nanoLC-MS/Trampa de iones (Ultimate 3000, Dionex y Esquire HCT Ultra Ion Trap, Bruker Daltonics). La adquisición y la explotación de fragmentaciones peptídicas son de tipo CID ("Disociación de Colisión Inducida").

El análisis del extracto 3 por LC-MS/MS ha dado lugar a la fragmentación de más de 2501 péptidos. Esta muy importante cifra traduce la gran complejidad de la muestra.

Ejemplo 4

Actividad de hidrolizado sobre la lipólisis

La eficacia sobre la lipólisis desde varias muestras de hidrolizados ha sido probada siguiendo la evolución del tamaño de las vacuolas lipídicas de células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos en función de la concentración en el hidrolizado.

Por esto, se efectúa un análisis morfométrico de las vacuolas a diferentes concentraciones de varios hidrolizados obtenidos por el procedimiento de la presente invención (H 161, H 162, H 163, H 301, H 302 y H 303) durante una duración de 72 horas. El solvente utilizado para diluir el TNF alfa o los hidrolizados durante esta experimentación es el agua. El medio de cultivo utilizado para las células 3T3-L1 es del medio DMEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia).

El análisis morfométrico de las vacuolas en diferentes concentraciones de TNF alfa hacen de testigo positivo.

Los análisis morfométricos de las vacuolas a diferentes concentraciones de un hidrolizado inactivo (H 0bis) o en ausencia de TNF alfa o hidrolizado sirven de testigos negativos. El hidrolizado inactivo es obtenido a partir de una

ES 2 361 348 A1

primera materia triturada, lavado 3 veces en 4 volúmenes de una mezcla de agua + 5% de dodecil sulfato de sodio (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia). El triturado es a continuación secado bajo vacío y reducido a polvo.

Los resultados son presentados en la siguiente tabla 3.

TABLA 3

Efecto del TNF alfa y de los hidrolizados H0bis, H161, H162, H163, H301, H302 y H303 sobre el tamaño medio de las vacuolas lipídicas

TNF alfa	Concentración (nM)	0	5	50	-
	Talla mediana (µm)	4,81	2,47	1,25	-
	% con relación a TNF alfa = 0 nM	100	51,3	26,1	-
H 0bis	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50	250
	Talla mediana (µm)	4,64	4,67	4,59	4,66
	% con relación a TNF alfa = 0 nM	96,5	97,1	95,4	96,9
H 161	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50	250
	Talla mediana (µm)	4,71	4,14	3,61	3,32
	% con relación a TNF alfa = 0 nM	93,4	82,1	71,6	65,9
H 162	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50	250
	Talla mediana (µm)	4,62	4,07	3,69	3,55
	% con relación a	91,6	80,7	73,3	70,5

ES 2 361 348 A1

	TNF alfa = 0 nM				
H 163	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50	250
	Talla mediana (µm)	4,82	4,01	3,56	3,05
	% con relación a TNF alfa = 0 nM	95,5	79,5	70,6	60,6
H 301	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50	250
	Talla mediana (µm)	4,78	4,16	3,34	3,08
	% con relación a TNF alfa = 0 nM	94,9	82,5	66,2	61,1
H 302	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50	250
	Talla mediana (µm)	4,67	3,60	2,92	2,42
	% con relación a TNF alfa = 0 nM	92,6	71,4	58,0	48,1
H 303	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50	250
	Talla mediana (µm)	4,54	3,31	2,82	2,18
	% con relación a TNF alfa = 0 nM	90,1	65,7	56,0	43,3

Este experimento demuestra que los hidrolizados probados permiten disminuir de 17,5 a 34,3% el tamaño de vacuolas lipídicas desde 5 µg/mL de hidrolizado a 50 µg/mL de hidrolizado, el tamaño de las vacuolas se disminuye de 26,7 a 44%. En 250 µg/mL de hidrolizado, la reducción del tamaño de las vacuolas alcanza incluso valores que van de 29,5 a 56,7%.

Estos resultados, ilustrados por las figuras 4A a 4C muestran que los hidrolizados probados permiten disminuir significativamente el tamaño de las vacuolas lipídicas, sugiriendo aplicaciones interesantes de los hidrolizados sobre la masa grasa (acción sobre la celulitis, pérdida de peso, reequilibrio fisiológico, etc.).

Ejemplo 5

Efectos del hidrolizado sobre la hipertrofia muscular

5 El efecto sobre la hipertrofia muscular de varias muestras de hidrolizado se han probado siguiendo la evolución del tamaño de células C2C12 induce a diferenciarse en miotubos en función de la concentración en el hidrolizado.

10 Por esto, se efectúa un análisis morfométrico de los miotubos después de la incubación con diferentes concentraciones de varios hidrolizados obtenidos por el procedimiento de la presente invención (H 161, H 162, H 163, H601 y H 602) durante 6 horas. El solvente utilizado para diluir la testosterona o los hidrolizados durante esta experimentación es el agua. El medio de cultivo utilizado por las células C2C12 es del medio DMEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia).

15 El análisis morfométrico de los miotubos a diferentes concentraciones de testosterona sirven de testigo positivo.

Los análisis morfométricos de los miotubos a diferentes concentraciones de un hidrolizado inactivo (H 0bis) o en ausencia de testosterona o de hidrolizado sirven de testigos negativos. El hidrolizado inactivo se obtiene de la misma manera que el anterior.

20 Los resultados se presentan en la tabla 5 siguiente:

TABLA 4

Efecto de la testosterona y de los hidrolizados H0bis, H162, H163, H601 y H602 sobre el diámetro de los miotubos y sobre el porcentaje de miotubos que van de un diámetro superior a 29 µm

Testosterona	Concentración (nM)	0	10	1000
	Diámetro (µm)	27,7	36,7	38,5
	% de miotubo con un diámetro > 29 µm	35,0	65,0	70,0
	% con respecto a testosterona = 0 nM	100	132	139

ES 2 361 348 A1

H 0bis	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50
	Diámetro (µm)	27,9	27,1	27,3
	% de miotubo con un diámetro > 29 µm	40,0	26,0	32,0
	% con respecto a testosterona = 0 nM	101	98	99
H 162	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50
	Diámetro (µm)	31,7	34,2	38,8
	% de miotubo con un diámetro > 29 µm	50,0	70,0	83,0
	% con respecto a testosterona = 0 nM	115	124	140
H 163	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50
	Diámetro (µm)	29,6	33,0	38,2
	% de miotubo con un diámetro > 29 µm	48,0	62,0	68,0
	% con respecto a testosterona = 0 nM	107	119	138
H 601	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50
	Diámetro (µm)	29,4	33,7	35,8

ES 2 361 348 A1

5		% de miotubo con un diámetro > 29 µm	49,0	64,0	74,0
		% con respecto a testosterona = 0 nM	106	122	129
10	H 602	Concentración (µg/mL)	0,5	5	50
15		Diámetro (µm)	28,7	36,2	36,9
20		% de miotubo con un diámetro > 29 µm	32,0	71,0	70,0
25		% con respecto a testosterona = 0 nM	104	131	133
30					

35 Esta experimentación demuestra que los hidrolizados probados permiten aumentar el diámetro de los miotubos de 4 a 15% desde 0,5 µg/mL de hidrolizado. A 5 µg/mL de hidrolizado, el diámetro de los miotubos aumenta de 19 a 31%. A 50 µg/mL de hidrolizado, el diámetro de los miotubos aumenta incluso de 29 a 40%. Además, el número de miotubos impactados es igualmente más importante con los hidrolizados.

40 Estos resultados, ilustrados por la figura 5, muestran que los hidrolizados probados permiten aumentar significativamente el diámetro de miotubos así como el porcentaje de miotubos impactados por esta hipertrofia, sugiriendo aplicaciones interesantes de los hidrolizados sobre la masa magra y la fisiología muscular.

Ejemplo 6

45 *Evaluación de la tolerancia “SEAPIAX (marca registrada)” administrado en la alimentación y sus efectos fisiológicos en la rata*

1- Objetivo general de la evaluación

50 El objetivo de este experimento es el de evaluar la tolerancia a una composición “SEAPIAX (marca registrada)” (composición que comprende solo como materia activa el hidrolizado H162 descrito más arriba) y evaluar los efectos inmunológicos de éste.

2- Materiales y métodos

2.1- Puntos generales

60 Las manipulaciones de los animales se condujeron de manera que se redujo el estrés de los animales al mínimo. Todos los experimentos se han realizado conforme a las exigencias del Ministerio de Agricultura Francés para los experimentos en animales de laboratorio (decreto 87-848). Los animales no habían sufrido ningún experimento antes del presente estudio.

2.2- Animales y ambiente

65 Se utilizaron veinte ratas Wistar, diez machos y diez hembras, con edades de ocho semanas. Estas ratas provienen del centro de cría René Janvier, France.

ES 2 361 348 A1

Las jaulas utilizadas son de tipo E, en policarbonato, de 45 cm de profundidad, 30 cm de largo y 20 cm de altura. Estas jaulas provienen de Iffa Credo, de la Arbresle, Francia. El número de animales por jaula es de dos o tres. El lecho utilizado es un lecho de epicea de tipo B8/20 proveniente de Safe, Francia.

La temperatura del cuarto es de 22°C +/- 1,5°C. La higrometría es de 50% +/- 25%. La luminosidad es de 50 Lux proveniente de una lámpara incandescente iluminada de 8 horas a 20 horas.

El alimento que contenía “SEAPIAX (marca registrada)” se preparó por Safe, Route St Brie, Augy, Francia. Era provista sin restricción. El agua era agua del grifo, también provista sin restricción.

2.3- Tratamiento

La “SEAPIAX (marca registrada)” se proveyó a las ratas a través de la alimentación durante toda la duración del experimento, es decir un mes.

El grupo controlado recibió como alimento el A04 que provenía de Safe, Francia. Los animales probados recibieron como alimento estrudados especialmente preparados para el estudio, que comprenden el alimento A04 enriquecido en contenido del 3% en “SEAPIAX (marca registrada)”. La dosis aproximada de “SEAPIAX (marca registrada)” es de 0,75 g/rata/día, es decir 2,5 g/kg/día por ratas de 300 g.

A la llegada al laboratorio, los animales se colocaron aleatoriamente en las jaulas de manera que se tenía un sub-grupo de cinco ratas macho probadas y, un sub-grupo de cinco ratas hembras probadas, un sub-grupo de cinco ratas machos controladas y un sub-grupo de cinco ratas hembras controladas.

2.4- Recolección de muestras sanguíneas

Los animales se probaron anestesiados con isoflurano. La sangre se recolectó a nivel del Sinus retro-orbital y se colocó en dos tubos los cuales contenían EDTA (para un análisis sanguíneo) y el otro litio de heparina (para una dosis metabólica).

El tubo para la dosis metabólica se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 4°C. El plasma a continuación se llevó y se almacenó a -80°C.

El tubo para el análisis sanguíneo se almacenó a temperatura ambiente y se analizó a las tres horas.

2.5- Datos analíticos

Los resultados son expresados en promedio +/- una desviación estándar. Se han analizado por ANOVA con dos vías y por una prueba de Student.

Una diferencia se considera como significativa desde que $p < 0,05$.

3- Resultados

Los resultados obtenidos relativos a la tasa de linfocitos se presentan en la tabla 7 a continuación.

TABLA 5

Medida de la tasa de linfocitos

Sexo	Grupo	% Tasa de linfocitos
Machos	Control	88,8 +/- 1,0
	“SEPIAX (marca registrada)”	91,1 +/- 1,0
Hembras	Control	88,7 +/- 0,3
	“SEPIAX (marca registrada)”	90,7 +/- 0,8

ES 2 361 348 A1

De manera interesante se ha comprobado, únicamente en los animales que consumieron los estrudados SEAPIAX (marca registrada), placas de Peyer muy desarrolladas. Hay que anotar que estos mismos animales no presentaron ni infecciones o inflamaciones intestinales.

En la tabla 5, los grupos “SEAPIAX (marca registrada)” corresponden a los grupos de ratas que hayan recibido la composición “SEAPIAX (marca registrada)” en su alimentación. Los grupos “Control” corresponden a los grupos de animales cuya alimentación no contiene composición “SEAPIAX (marca registrada)”.

Estos resultados muestran que “SEAPIAX (marca registrada)” permite aumentar significativamente la tasa de linfocitos en la sangre que estimula el desarrollo de las placas de Peyer. Las aplicaciones como estimulante son por lo tanto igualmente previstas para la composición “SEAPIAX (marca registrada)”.

Ejemplo 7

Evaluación de la tolerancia percibida y del efecto “SEAPIAX (marca registrada)” sobre el remodelaje corporal y la evolución de la relación masa grasa/masa magra en el hombre

1- Objetivo general de la evaluación

Una evaluación controlada y aleatoria de una duración de tres meses se realizó entre mujeres que tenían una ligera sobrecarga ponderal.

El objetivo de esta evaluación era determinar la tolerancia del producto al ensayo y su eficacia sobre una panoplia de experimentaciones.

2- Materiales y métodos

2.1- Producto de ensayo

El compuesto de ensayo, se presenta bajo la forma de comprimido, se denomina “SEAPIAX (marca registrada)” y comprende 1000 mg de un hidrolizado de sepia (*Sepia officinalis*) que corresponde a la referencia H162 cuyo procedimiento de obtención es descrito más arriba (tabla 1); 280 mg de excipientes que permiten la buena compresión del hidrolizado así como la película del comprimido: fosfato de calcio, carbonato de magnesio, polvo de limón, sílice, mono/di/triglicéridos de ácidos grasos, hidroxipropilmetil celulosa, celulosa microcristalina, ácido esteárico, clorofila.

Estos comprimidos se tomaron con un gran vaso de agua 20 minutos antes de cada comida.

Los productos se distribuían por el médico en embalajes neutros o codificados. Los voluntarios se repartieron en dos grupos del mismo efectivo después de la afectación por aleatorización.

2.2- Voluntarios

2.2.1- Criterios de inclusión

- Personas que hayan dado un consentimiento de libre claro y expresado por escrito
- Persona cooperante, advertida de la necesidad y de la duración de los controles
- Mujer con edad de 20 a 50 años
- Persona que tenga una sobrecarga ponderal ya sea un índice de Masa Corporal (IMC = peso en kg/(tamaño en metros)²) comprendido entre 25 y 30.
- Persona que tenga un peso estable desde al menos tres meses
- Persona que tenga un ritmo de alimentación regular (tres comidas por día)

2.2.2- Criterios de no inclusión

- Persona que presenta antecedentes conocidos de alergias alimentarias
- Persona en cinta o susceptible de serlo durante el estudio
- Persona en periodo de reposo o que halla estado en cama en los tres meses precedentes al estudio
- Mujer menopáusica

ES 2 361 348 A1

- Persona que haya tenido una enfermedad grave o evolutiva
- Persona en periodo de abandono o que haya detenido el consumo de tabaco desde al menos tres meses
- Persona que tenga un tratamiento susceptible de influenciar los parámetros medidos

2.2.3- Tratamientos asociados

En caso de la presencia de una patología asociada, no generada para la continuación del estudio, el tratamiento debe ser continuado durante el estudio, si es posible sin cambio de la posología

3- Tolerancia

56 mujeres son repartidas en dos grupos. 30 mujeres constituyen el grupo 1, las otras 26 el grupo 2.

Las mujeres del grupo 1 tomaban 6 comprimidos de “SEAPIAX (marca registrada)” por día durante tres meses. Las del grupo 2 tomaban 9 comprimidos por día durante tres meses. Estas recopilaciones de información se efectuaron al cuadragésimo segundo día (D42) y al octogésimo cuarto día (D84).

En el transcurso de la experiencia, cuatro mujeres del grupo 1 y 3 mujeres del grupo 2 no se presentaron en el día 84.

Para los dos grupos más del 95% de las mujeres toleraron el producto de ensayo.

“LA SEAPIAX (marca registrada)” puede por lo tanto ser considerada como bien tolerada por los usuarios.

4- Evolución del porcentaje de masa grasa

El porcentaje de masa grasa se determinó por impedanciometría (Bodystat 1500 y balance Tanita modelo TBF-300GS).

10 mujeres ejercieron una actividad deportiva regular antes y durante el experimento tomaron seis comprimidos de “SEAPIAX (marca registrada)” por día durante tres meses. Las medidas se realizaron el día del inicio del estudio (día 0) a día 42 y día 48.

Los resultados se presentan en la tabla 6 a continuación.

TABLA 6

Evolución del porcentaje de masa grasa (%)

	Promedio	p/día 0	ΔMedia/día 0	p/d 42	ΔMedia/d 42
Día 0	35,29				
Día 42	35,66	p= 0,262	+0,37		
Día 84	34,46	p=0,053	-0,83	p=0,003	-1,20

El porcentaje de grasa corporal disminuyó significativamente después de 84 días.

La misma experiencia se realizó en un grupo de 11 mujeres que habían tomado 9 comprimidos por día y habían ejercido menos de una hora de actividades deportivas por día antes y durante el experimento.

ES 2 361 348 A1

Los resultados son presentados en la tabla 7 siguiente.

TABLA 7

Evolución del porcentaje de masa grasa (%)

	Promedio	p/día 0	Δ Media/día 0	p/d 42	Δ Media/d 42
Día 0	36,99				
Día 42	36,53	p=0,11	-0,46		
Día 84	36,32	P=0,037	-0,67	p=0,496	-0,21

El porcentaje de masa grasa disminuyó igualmente de manera significativa después de 84 días para este grupo de mujeres.

5- Evolución de la cantidad de masa grasa

La cantidad de masa grasa se determinó por impedanciometría (Bodystat 1500 y balance Tanita, modelo TBF-300GS).

16 mujeres ejercieron una actividad deportiva antes y durante el experimento tomaron seis comprimidos de “SEA-PIAX (marca registrada)” por día durante tres meses. Las medidas se realizaron el día del estudio (DO), a D42 y a D84.

Los resultados son presentados en la tabla 8 siguiente.

TABLA 8

Evolución de la cantidad de masa grasa (kg)

	Promedio	p/día 0	Δ Media/día 0	p/d 42	Δ Media/d 42
Día 0	25,53				
Día 42	25,70	p=0,486	+0,17		
Día 84	24,71	p=0,027	-0,82	p=0,007	-0,99

La cantidad de masa grasa disminuyó significativamente después de 84 días.

La misma experiencia se realizó en un grupo de 11 mujeres que habían tomado nueve comprimidos por día y habían ejercido menos de una hora de actividad deportiva por día antes y durante el experimento.

ES 2 361 348 A1

Los resultados se presentan en la tabla 9 siguiente.

TABLA 9

Evolución de la cantidad de masa grasa (kg)

	Promedio	p/día 0	ΔMedia/día 0	p/d 42	ΔMedia/d 42
Día 0	27,47				
Día 42	27,02	p=0,084	-0,45		
Día 84	26,80	p=0,041	-0,67	p=0,295	-0,22

La cantidad de masa grasa tuvo igualmente disminución de manera significativa después de 84 días para este grupo de mujeres.

6- Evolución de la medida de centímetros del contorno de talla

26 mujeres tomaron seis comprimidos de “SEAPIAX (marca registrada)” por día durante tres meses. Las medidas se realizaron el día del inicio del estudio (D0), a D42 y a D84.

Los resultados se presentan en la tabla 10 siguiente.

TABLA 10

Evolución del contorno de talla (cm)

	Promedio	p/día 0	ΔMedia/día 0	p/d 42	ΔMedia/d 42
Día 0	88,39				
Día 42	88,00	p=0,144	-0,39		
Día 84	87,58	p=0,026	-0,81	p=0,094	-0,42

El contorno de talla disminuyó significativamente después de 84 días de consumo del producto de ensayo.

La misma experiencia se realizó con 23 mujeres que tomaron nueve comprimidos de “SEAPIAX (marca registrada)”.

Los resultados se presentan en la tabla 11 siguiente.

TABLA 11

Evolución del contorno de talla (cm)

	Promedio	p/día 0	ΔMedia/día 0	p/d 42	ΔMedia/d 42
Día 0	90,96				
Día 42	90,48	p=0,126	-0,48		
Día 84	89,96	p=0,018	-1,00	p=0,124	-0,52

El contorno de talla disminuyó igualmente de manera significativa después de 84 días de consumo del producto de ensayo para este grupo de mujeres.

ES 2 361 348 A1

7- Evolución de la medida en centímetros del contorno de cadera

26 mujeres tomaron seis comprimidos de “SEAPIAX (marca registrada)” por día durante tres meses. Las medidas se realizaron el día del inicio del estudio (D0), a D42 y a D84.

Los resultados se presentan en la tabla 12 siguiente.

TABLA 12
Evolución del contorno de cadera (cm)

	Promedio	p/día 0	ΔMedia/día 0	p/d 42	ΔMedia/d 42
Día 0	96,04				
Día 42	95,50	P=0,050	-0,54		
Día 84	95,29	P=0,037	-0,75	p=0,384	-0,21

El contorno de talla disminuyó de manera significativa desde el día 42 de consumo del producto de ensayo. Este resultado se confirmó después de 84 días.

La misma experiencia se realizó con 23 mujeres que tomaron nueve comprimidos de “SEAPIAX (marca registrada)” por día.

Los resultados se presentan en la tabla 13 siguiente.

TABLA 13
Evolución del contorno de talla (cm)

	Promedio	p/día 0	ΔMedia/día 0	p/d 42	ΔMedia/d 42
Día 0	98,35				
Día 42	97,44	P=0,083	-0,91		
Día 84	97,37	P=0,006	-0,98	p=0,873	-0,07

El contorno de talla disminuyó igualmente de manera significativa después de 84 días de consumo del producto de ensayo para este grupo de mujeres.

8- Evaluación subjetiva de la eficacia de “SEAPIAX (marca registrada)”

49 mujeres que habían consumido seis (grupo 1) o nueve (grupo 2) comprimidos por día durante tres meses dieron su opinión sobre la eficacia percibida de “SEAPIAX (marca registrada)”.

8.1- Eficacia percibida en la disminución de los deseos de picotear y en la saciedad

Desde el día 42 del consumo del producto de ensayo, la eficacia se percibió de manera muy importante en la disminución del deseo de picotear y la sensación de saciedad en los dos grupos con una tasa de eficacia percibida respectivamente de 80 y 79%. Después del día 84, estas tasas se elevaron al 83% para la disminución de los deseos de picotear y 74% sobre la sensación de saciedad.

8.2- Eficacia percibida sobre el bienestar

Después del día 84, el 78% de las mujeres del grupo 2 percibieron la eficacia del producto de ensayo sobre la vitalidad, el dinamismo, la tonicidad y el confort digestivo.

En el grupo 1, 77% de las mujeres percibieron la eficacia del producto de ensayo en la vitalidad, el dinamismo, la tonicidad y 64% en la fuerza muscular.

8.3- *Eficacia percibida en la piel, los cabellos y las uñas*

En D84 la eficacia percibida para hidratación de la piel era del 73%, y del 68% para la fuerza de los cabellos y la solidez de las uñas.

5

El conjunto de los experimentos descritos más arriba demuestran que el hidrolizado según la presente invención posee propiedades muy interesantes que pueden ser puestos en aplicación para frenar o detener los procesos de degeneración muscular, o aumentar el desarrollo muscular, disminuir la masa grasa en beneficio de la masa seca, luchar contra patologías musculares, disminuir la absorción de nutrientes a nivel intestinal, reforzar el sistema inmunitario, y
10 aumentar la tasa de hemoglobina y/o de hematocrito, disminuir la celulitis, y/o aumentar la saciedad.

La presente invención forma por lo tanto una herramienta destacable, particularmente para los usos precitados.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de un hidrolizado de vísceras de animales marinos que comprenden las siguientes etapas:
- (a) mezcla de coproductos de animales marinos,
- (b) calentamiento de la mezcla obtenida en la etapa (a) a una temperatura que va de 30 a 65°C,
- 10 (c) ajuste del pH de la mezcla obtenida en la etapa (b) a un valor que va de 1 a 8,
- (d) hidrolizado enzimático de la mezcla obtenida en la etapa (c) durante una duración que va de 1 a 8 horas,
- 15 (e) calentamiento del hidrolizado obtenido en la etapa (d) a una temperatura que va de 75 a 150°C, y
- (f) enfriamiento del hidrolizado obtenido.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en la cual los animales marinos son cefalópodos.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en la cual la etapa (a) comprende además una etapa de dilución de la mezcla de vísceras de animales marinos con agua.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en la cual la dilución se opera en una relación agua/mezcla de vísceras de animales marinos que van de 0,5 a 3.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la cual el pH se ajusta a un valor que va de 2 a 6.
- 30 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la cual la etapa de hidrólisis (d) se realiza durante una duración de 3 horas.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una etapa de recubrimiento/gelación de hidrolizado obtenido en la etapa (e) con polisacáridos.
- 35 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una etapa (g) de secado, sucesivo a la etapa (f).
9. Hidrolizado susceptible de ser obtenido por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 40 10. Hidrolizado según la reivindicación 9, que comprende 70% en peso de proteínas cuyo peso molecular es inferior a 4,4 kDa.
- 45 11. Hidrolizado según la reivindicación 9 o 10, que comprende además 2.3% de taurina.
12. Utilización del hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para fabricar medicamento, alimento o aditivo o complemento alimentario destinado a frenar o detener los procesos de degeneración muscular, fomentar el desarrollo muscular, disminuir la masa grasa en beneficio de la masa seca, luchar contra patologías musculares. Disminuir la absorción de nutrientes a nivel intestinal, reforzar el sistema inmunitario, aumentar la tasa de hemoglobina y/o de hematocrito, disminuir la celulitis, y/o aumentar la saciedad.
- 50
- 55
- 60
- 65

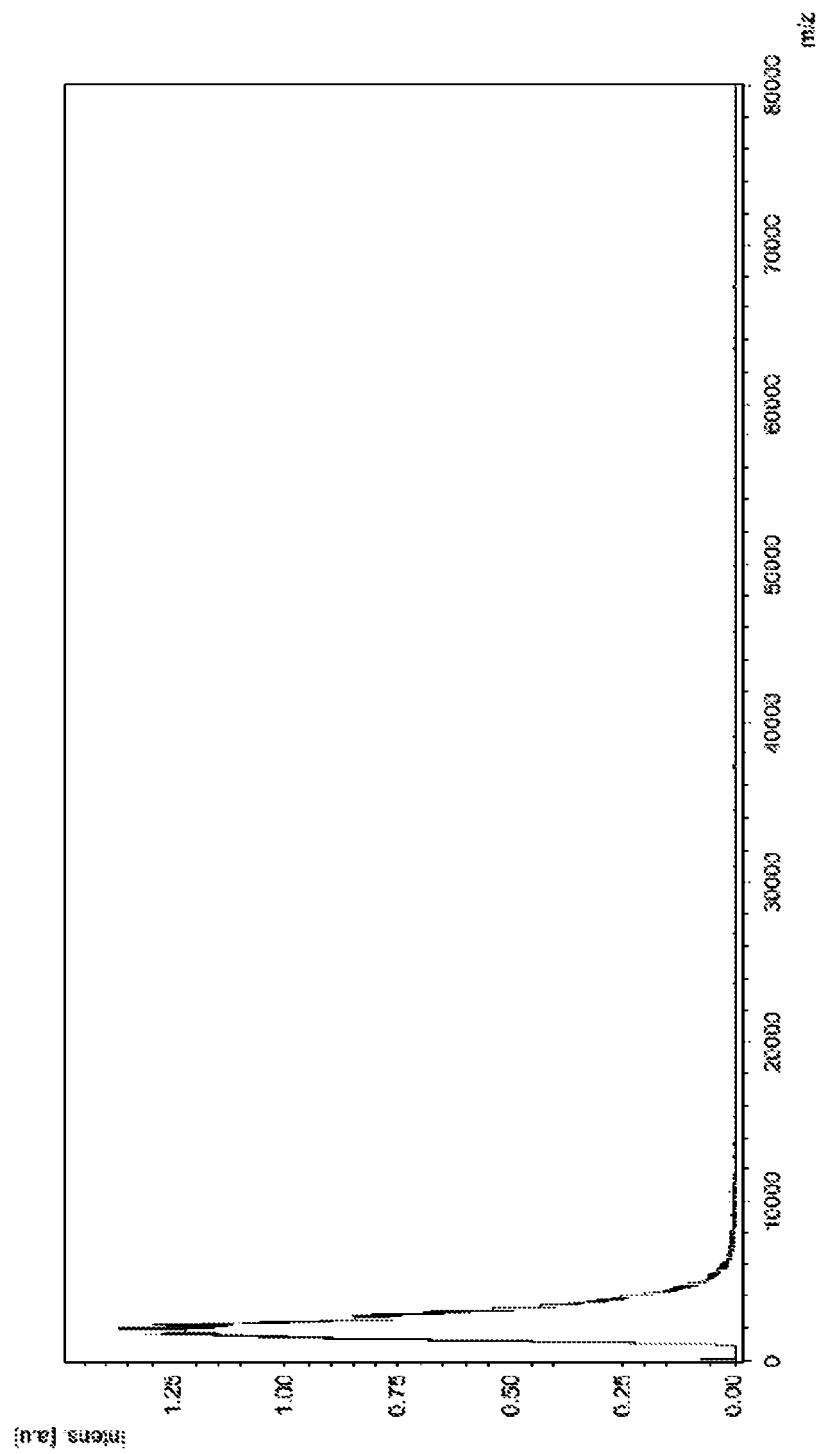


Figura 1

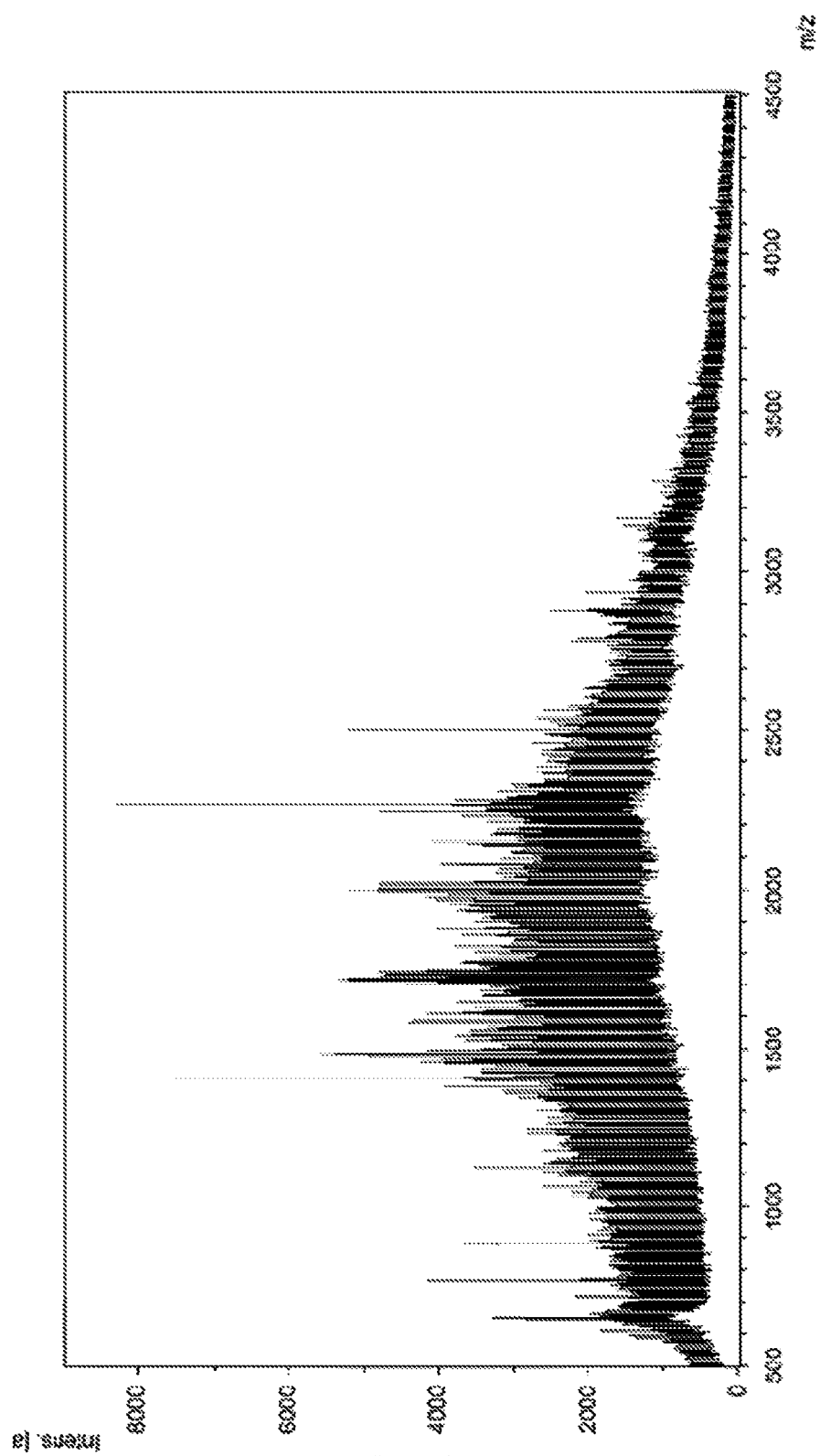


Figura 2

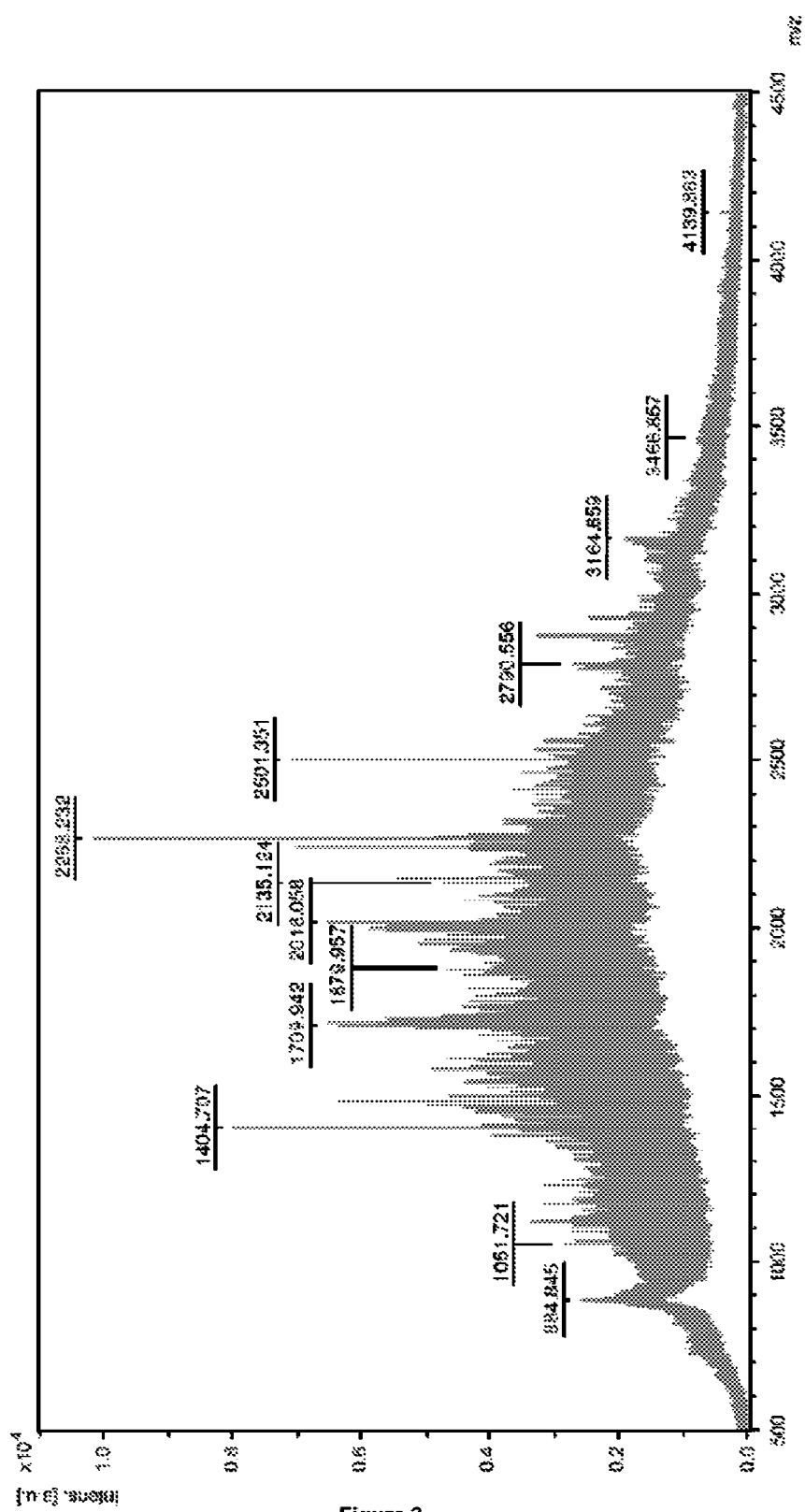


Figura 3

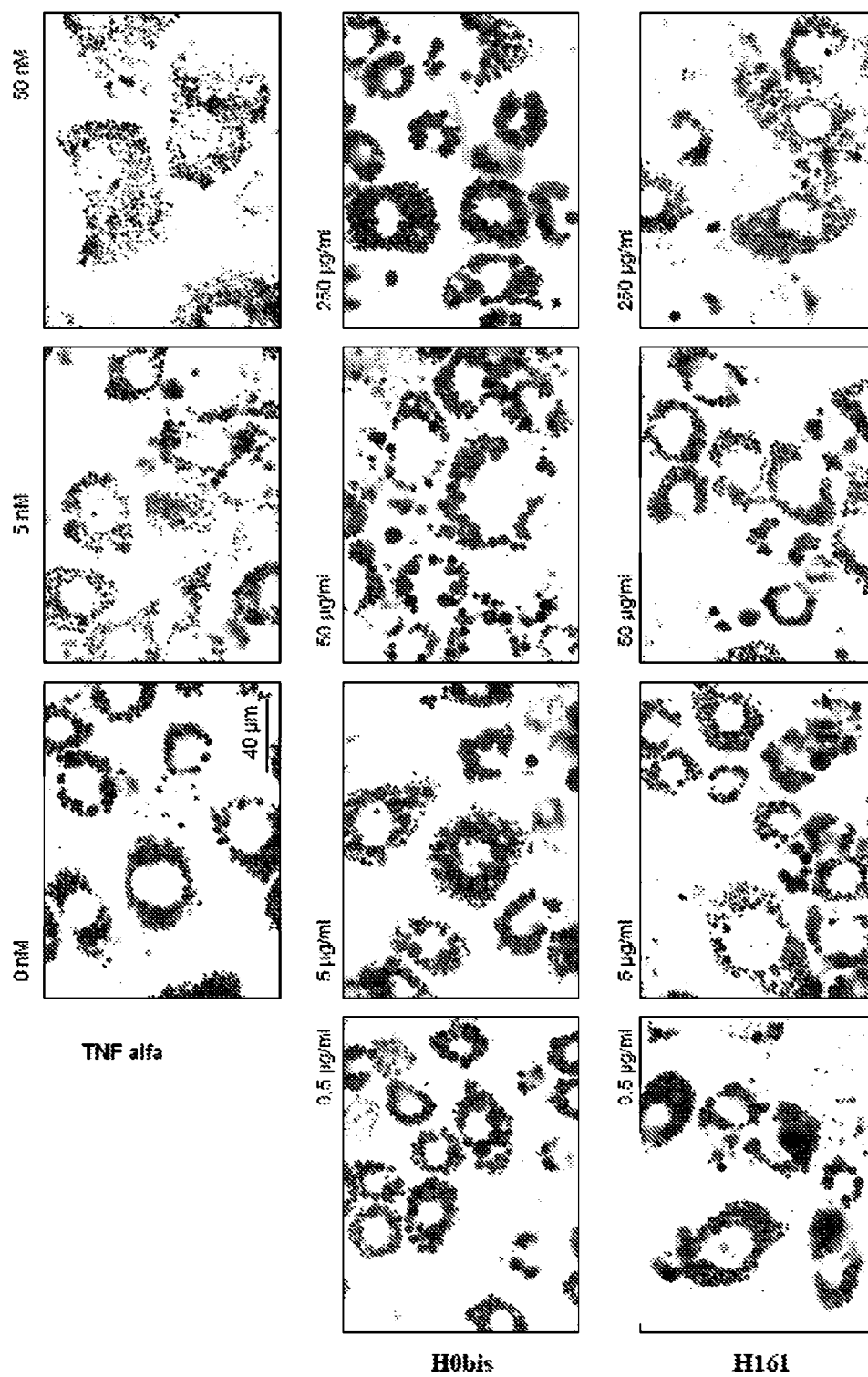


Figura 4A

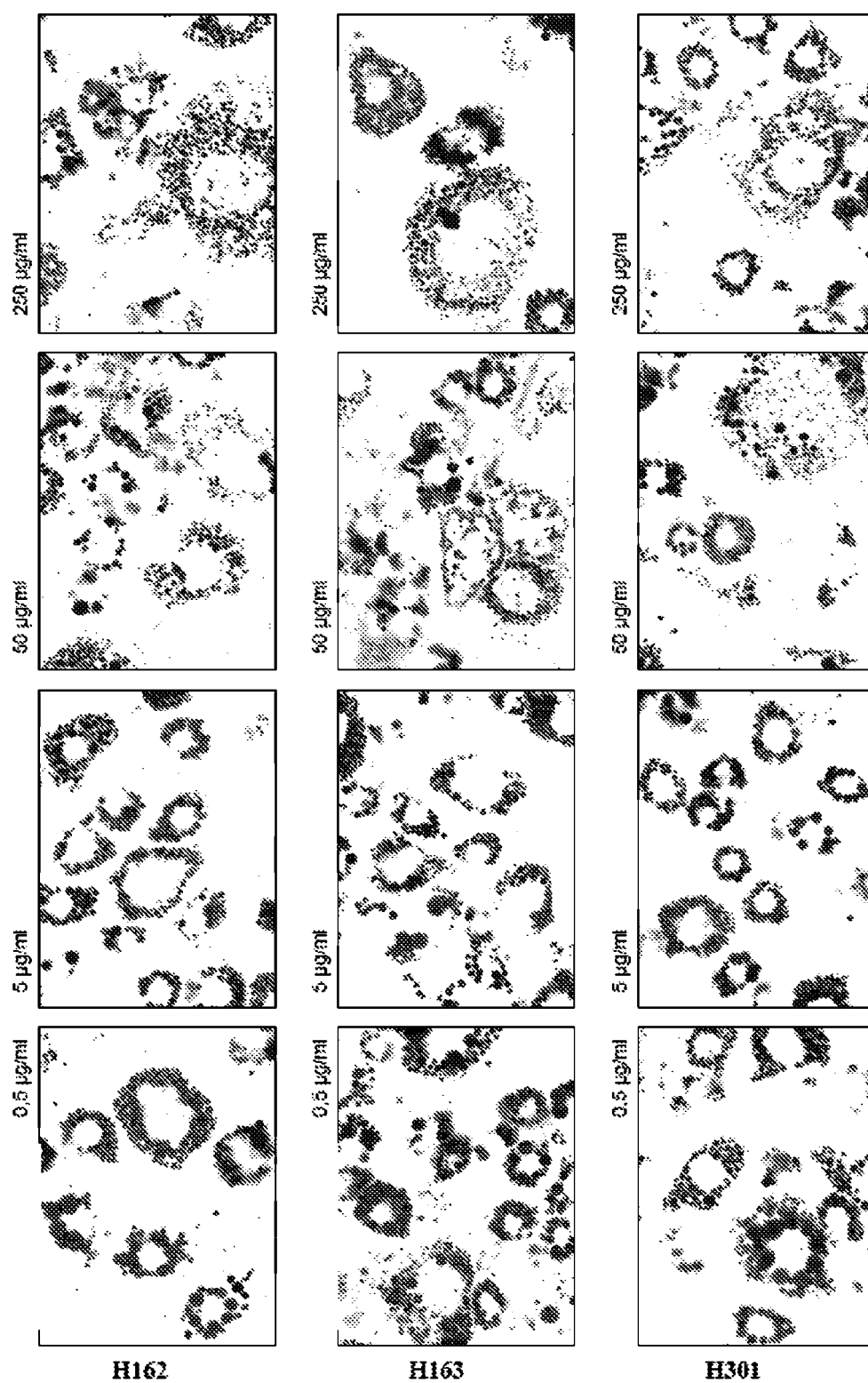


Figura 4B

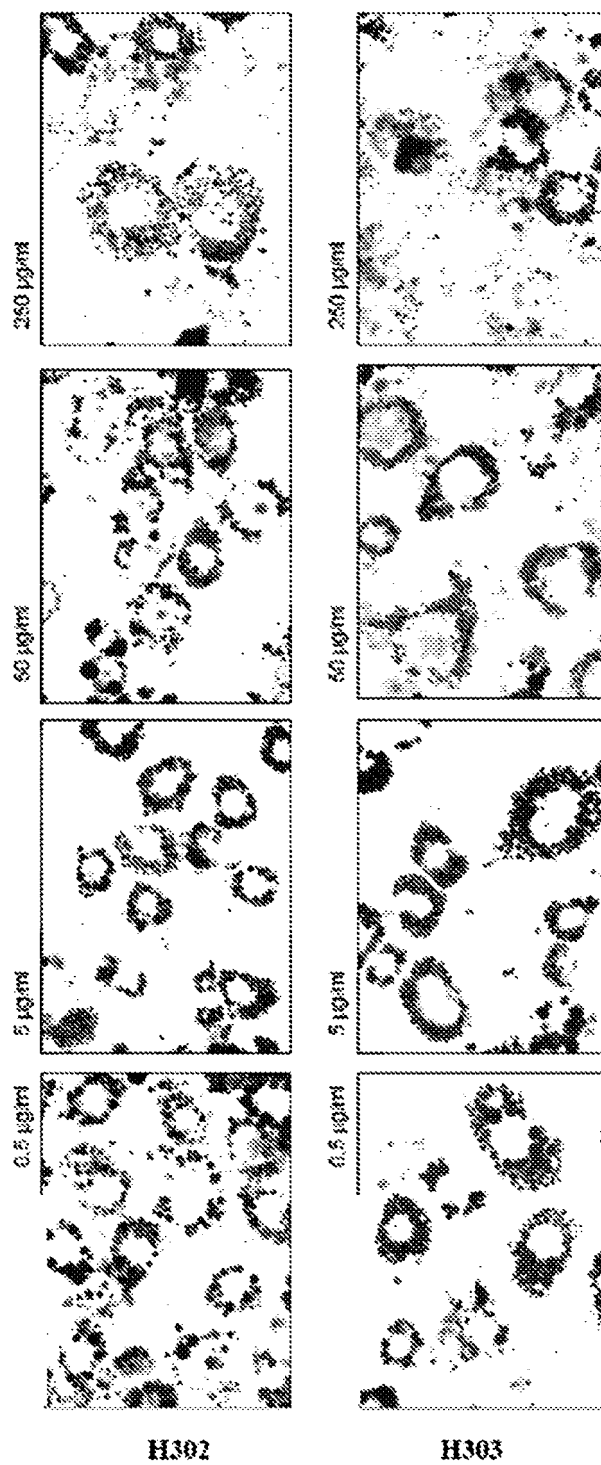


Figura 4C

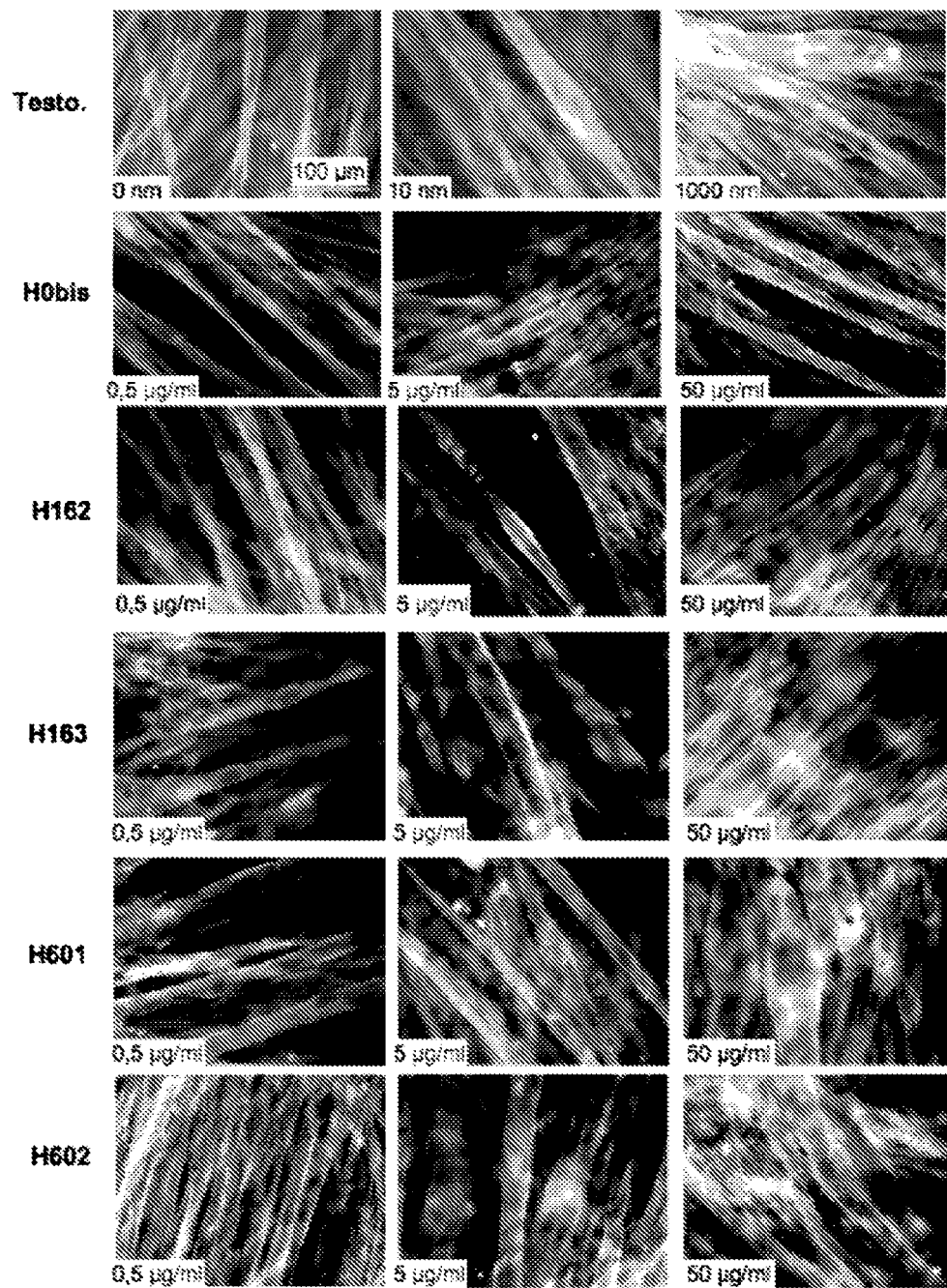


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031393

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.09.2010

③② Fecha de prioridad: **18-09-2009**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2006099305 A1 (LEE et al.) 11.05.2006, párrafos 3-8,16,19,23; figura 1; tabla 1; reivindicaciones.	1-4,6-9,12
X	US 2004038391 A1 (PYNTIKOV) 26.02.2004, párrafos 3,24,25,41,42,43,47,50,52,69,73,81,99; reivindicación 17.	1,3,4,6-11
X	US 6153251 A (YAMAME Y MUNEMURA) 28.11.2000, columna 1, línea 56 – columna 2, línea 31; ejemplos 1-3; reivindicaciones.	1-4,7-12
X	US 7070953 B1 (NORDUR EHF) 04.07.2006, columna 3, línea 46 – columna 4, línea 11; columna 5, líneas 1-3,20-59; ejemplos 3,7,8,1; columna 7, líneas 26-38; reivindicaciones 1,2,17,21,24.	1-9
X	FR 2304671 A1 (DER TOROSSIAN JEAN) 15.10.1976, página 1, líneas 1-6; página 1, línea 24 – página 2, línea 26; página 2, líneas 36-39; página 3, líneas 1-8; reivindicación.	1-5,7-9
X	FR 2907129 A1 (UNIVERSITE DE CAEN BASSE NORMANDIE UMR IFREMER) 18.04.2008, página 1, líneas 5-19, página 3, líneas 25-35; página 5, líneas 17-23; ejemplos 1,2.	1-5,7-12
X	KECHAOU, et al. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (<i>Sepia officinalis</i>) and sardine (<i>Sardina pilchardus</i>) viscera using commercial proteases: effect on lipid distribution and amino acid composition. Journal of Bioscience and Bioengineering, feb. 2009, vol. 107 (2) páginas 158-164.	1-4,7-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.05.2011

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P21/06 (2006.01)

C12S3/24 (2006.01)

A23J3/04 (2006.01)

A23J3/34 (2006.01)

A23J1/04 (2006.01)

A23L1/325 (2006.01)

A23L1/333 (2006.01)

A61K35/56 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12S, A23J, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2006099305 A1 (LEE et al.)	11.05.2006
D02	US 2004038391 A1 (PYNTIKOV)	26.02.2004
D03	US 6153251 A (YAMAME Y MUNEMURA)	28.11.2000
D04	US 7070953 B1 (NORDUR EHF)	04.07.2006
D05	FR 2304671 A1 (DER TOROSSIAN JEAN)	15.10.1976
D06	FR 2907129 A1 (UNIVERSITE DE CAEN BASSE NORMANDIE UMR IFREMER)	18.04.2008
D07	KECHAOU, et al. Journal of Bioscience and Bioengineering 107	2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un procedimiento (reivindicaciones 1-8) de obtención de un hidrolizado de vísceras de animales marinos, que según la reivindicación independiente 1, comprende las etapas de:

- Mezclar
- Calentar a una temperatura de entre 30 a 65°C
- Ajustar el pH entre 1 a 8
- Hidrolizar enzimáticamente durante 1 a 8 horas
- Calentar a una temperatura de entre 75 a 150°C
- Enfriar el hidrolizado

También es objeto de la invención el hidrolizado obtenido (reivindicaciones 9-11) y su uso para la fabricación de un alimento o un medicamento (reivindicación 12)

Novedad y actividad inventiva (art. 6. 2 y 8.2 de la Ley de Patentes)

El estado de la técnica anterior describe procedimientos de hidrólisis enzimática para obtener hidrolizados de animales marinos, así como su utilización en aditivos alimentarios, en cosméticos y medicamentos.

El documento D1 describe un procedimiento para preparar un hidrolizado a partir de productos de desecho del calamar que comprende homogeneizarlos y someterlos a una autólisis a 55°C de temperatura durante 2 a 5 horas. Las enzimas se inactivan a 75°C y posteriormente se seca el hidrolizado (párrafos 3-8, 16, 19, 23; figura 1; tabla 1; reivindicaciones). El producto obtenido se puede utilizar como complemento alimenticio para mejorar la inmunidad.

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1-4, 8, 9, 12.

El documento D2 trata de hidrolizados obtenidos de desechos de animales marinos, incluyendo sus vísceras, por hidrólisis enzimática mediante enzimas obtenidas de peces de agua fría. El procedimiento se lleva a cabo en las siguientes etapas: mezcla con agua en proporción 1:1, hidrólisis durante menos de 3 horas a una temperatura de 45°C y a pH ligeramente alcalino (de 7,8 a 8), seguido de un calentamiento a 95°C y posterior enfriamiento y secado (párrafos 41, 47, 50, 52, 73). El hidrolizado obtenido tiene más de un 75% de aminoácidos libres, además de pequeños péptidos y contiene taurina (párrafos 3, 24, 25, 42, 43, 69, 81, 99, reivindicación 17).

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 8-11.

El documento D3 divulga hidrolizados de animales marinos, entre los que se citan las vísceras de sepia, de sardina, etc. que comprende dividir y mezclar el material, someterlo a una hidrólisis enzimática con una peptidasa a una temperatura de entre 30 a 60°C durante 1 a 2 horas y luego inactivar la enzima calentando por encima de 80°C (columna 1, línea 56- columna 2, línea 31; ejemplos 1-3, reivindicaciones). El hidrolizado se utiliza como complemento alimenticio para animales para mejorar su crecimiento y su inmunidad.

A la vista de este documento, las reivindicaciones 1-4, 8, 9, 12 carecen de novedad.

El documento D4 describe la obtención de un hidrolizado a partir de organismo marinos y de sus co-productos (columna 7, líneas 26-38) con enzimas obtenidas de vísceras de bacalao. La materia prima se mezcla con agua, se hidroliza a temperaturas inferiores a 60°C durante un tiempo de 1 a 10 horas y a un pH de 6 a 11 y posteriormente se inactiva la enzima a una temperatura superior a 70°C. El producto hidrolizado se puede secar y gelificar posteriormente (columna 3, línea 46- columna 4, línea 11; columna 5, líneas 1-3; líneas 20-59; ejemplos 3, 7, 8, 11; reivindicaciones 1, 2, 17, 21, 24). El hidrolizado se utiliza para alimentación humana y animal y en cosmética.

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones 1-5, 7-9.

Los demás documentos citados en el informe sobre el estado de la técnica describen procedimientos para obtener hidrolizados de animales marinos con la diferencia de que la hidrólisis se lleva cabo durante más tiempo.

El documento de patente D5 divulga un procedimiento para hidrolizar vísceras y desechos de peces con objeto de obtener un hidrolizado que se utilice para alimento animal o humano (página 1, líneas 1-6; página 3 líneas 1-8). El procedimiento consiste en mezclar los desechos con agua, ajustar el pH de la mezcla a 2, hidrolizar con pepsina a una temperatura de entre 40 a 42°C durante 72 horas y posteriormente elevar la temperatura a 80°C para destruir las enzimas restantes y las bacterias (página 1, línea 24-página 2, línea 26; página 2, líneas 36-39; reivindicación).

El documento D6 describe un procedimiento para licuar los órganos digestivos de sepia mediante sus enzimas endógenas y obtener una composición que se puede utilizar como alimento. El procedimiento se realiza a una temperatura de 4 o 25°C durante 50 días a pH inferior a 6 (página 1, líneas 5-19; página 3, líneas 25-35; página 5, líneas 17-23; ejemplos 1, 2).

El artículo D7 trata de la hidrólisis enzimática de vísceras de sepia y sardina llevada a cabo durante 24 horas a 50°C con alcalasa y a pH 8.

En principio, estos tres documentos no afectan a la novedad de la reivindicación independiente de procedimiento porque el tiempo de hidrólisis es mayor, pero estos documentos sí afectan a la actividad inventiva de la misma, ya que sería obvio para un experto en la materia tratar de acortar los tiempos de hidrólisis si con ello se logra la suficiente hidrolización (que depende de la enzima utilizada y las condiciones en la que la hidrolización se lleve a cabo).

Por otro lado, las reivindicaciones 10 y 11 de la invención se refieren a algunas características técnicas de uno de los hidrolizados obtenido a partir de la sepia, concretamente a su contenido en taurina y en aminoácidos o péptidos. En principio, y salvo que se demuestre lo contrario, es de esperar que los hidrolizados provenientes de sepia, descritos en los documentos D3, D6 y D7, obtenidos por procedimientos muy similares a los de la invención tendrán la misma composición que el de la invención. Por ello, los documentos D3, D6 y D7 afectan a la actividad inventiva de las reivindicaciones de producto 9-11.