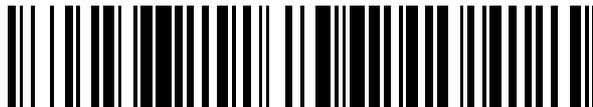


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 793**

51 Int. Cl.:

<b>A21D 2/18</b>	(2006.01) <b>A23K 1/18</b>	(2006.01)
<b>A21D 13/08</b>	(2006.01) <b>A23L 1/168</b>	(2006.01)
<b>A21D 13/02</b>	(2006.01)	
<b>A21D 13/04</b>	(2006.01)	
<b>A21D 13/06</b>	(2006.01)	
<b>A23L 1/164</b>	(2006.01)	
<b>A23L 1/182</b>	(2006.01)	
<b>A23L 1/29</b>	(2006.01)	
<b>A23L 1/30</b>	(2006.01)	
<b>A23L 1/10</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2004 E 04292966 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1541026**

54 Título: **Productos de cereales que poseen un alto poder anti-oxidante**

30 Prioridad:

**12.12.2003 FR 0314644**

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

**04.06.2014**

73 Titular/es:

**INTERCONTINENTAL GREAT BRANDS LLC  
(100.0%)  
100 Deforest Avenue  
East Hanover, NJ 07936, US**

72 Inventor/es:

**JIMENEZ, LILIANA G.;  
DARDE, OLIVIER;  
LAMICHE, CHANTAL;  
MATHIEU, FLORENCE;  
SCHLUMBERGER, ARMELLE y  
COHIN, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 464 793 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**

Productos de cereales que poseen un alto poder anti-oxidante

5 La presente invención se refiere a un producto de cereales que posee un alto poder antioxidante, un procedimiento para su fabricación, así como su utilización con el fin de aumentar la aportación en antioxidantes naturales y/o en vitaminas B1, B9, y/o en minerales: cinc, magnesio y selenio y/o en fibras; así como en prevenir los efectos nocivos vinculados al estrés oxidativo y la decadencia de las funciones cognitivas e inmunitarias.

10 Los cereales completos son ricos en fibras, almidón, proteínas, vitaminas y minerales. Son también fuentes importantes de almidón resistente, de oligosacáridos, minerales-traza y otros compuestos de interés cuyos algunos antioxidantes tales como polifenoles, fito-estrógeno, etc. La mayoría de estos constituyentes no se encuentran repartidos equitativamente en el seno del grano de cereal. Ahora bien, casi todos los productos de cereales consumidos actualmente están en forma de cereales refinados; durante la molienda, se pueden separar algunas fracciones, lo que implica generalmente un empobrecimiento importante en numerosos constituyentes de las harinas obtenidas. En efecto, estos constituyentes se reparten desigualmente en el grano.

- 15 • vitaminas y minerales: por término medio, solamente 25% de los minerales del grano están contenido en el endosperma, el resto se encuentra generalmente en las cascarillas externas: capa de aleuronas, germen y salvado.
- fibras: este término designa principalmente algunos compuestos de la pared vegetal que son la celulosa, la hemicelulosa y la pectina (los polisacáridos no almidón). Algunos autores incluyen también el almidón resistente. La lignina, un compuesto no sacarídico de la pared vegetal, también a menudo se considera como formando parte de las fibras.
- 20 • los polifenoles: los más corrientes son los ácidos ferúlico y p-cumárico, pero los fito-estrógenos, lignanos y flavonoides están también presentes. Todos estos constituyentes vinculados a los pentosanos parecen encontrarse principalmente en la capa de aleuronas y en el salvado.

Este reparto particular implica casi inevitablemente pérdidas durante la molienda.

25 Varios tejidos del grano de trigo, capa de aleuronas, salvado y germen, aparecen, por lo tanto, como especialmente interesantes desde un punto de vista nutricional. Sin embargo, se encuentran generalmente separados durante la fabricación de la harina refinada.

30 La molienda es esencialmente el procedimiento que permite obtener harina a partir de un grano entero. Durante esta etapa, el salvado y el germen se separan del endosperma rico en almidón. La harina refinada procede, por lo tanto, casi únicamente del endosperma del grano; las otras fracciones del grano se excluyen casi completamente, lo que implica la pérdida de los elementos contenidos preferentemente en el salvado y el germen.

Las fracciones obtenidas (germen, salvados, moyuelos, etc) pueden, a excepción del germen, eventualmente ser reincorporadas a la harina refinada para formar harina más o menos "completa".

35 La harina blanca, procedente del endosperma, es generalmente claramente menos rica en micronutrientes y en fibras que las otras fracciones. Al utilizar harina refinada, se pierde, por lo tanto, una gran parte del potencial nutricional del grano de los cereales.

40 Así, durante la utilización de la harina refinada de trigo, desaparece finalmente alrededor de  $\frac{3}{4}$  parte del contenido del grano en minerales entre el grano de trigo y la harina blanca. Esta última es también mucho menos rica en fibras que el grano de trigo entero (4% contra 12%), aunque es proporcionalmente más rica en fibras solubles (40% de las fibras totales contra menos de un 20% para el grano entero).

Durante el refinado, debido a la separación de la mayor parte del salvado y de una parte del germen, hay también, generalmente, pérdida de numerosos constituyentes de cereales completos tales como los lignanos, los fito-estrógenos, los compuestos fenólicos y el ácido fítico.

45 La tabla 1 presenta la pérdida media de micronutrientes del trigo durante la fabricación de una harina blanca convencional:

Tabla 1

## Pérdida de micronutrientes del trigo durante la fabricación de la harina blanca (datos de la literatura)

Nutrientes (mg/100 g)	Grano entero	Harina blanca (T55)	Pérdida
Vitamina B1	0,5	0,2	60%
Vitamina B2	0,15	0,05	67%
Vitamina B6	0,5	0,05	90%
Vitamina E	3,5	0,5	86%
Magnesio	150	30	80%
Hierro	6	1,5	75%
Cinc	4,1	0,8	80%
Polifenoles	90-198	6	93 - 97%
Fibras	12	2,1	82,5%

Así, más del 60% de todos los micronutrientes del trigo, generalmente, ya no se encuentran en la harina blanca.

- 5 Ahora bien estos micronutrientes se asociaron a un menor riesgo de distintas patologías, tales como algunas enfermedades cardiovasculares, y algunos tipos de cánceres, principalmente, el cáncer de colon, cuando se consumen en los cereales completos.

- 10 Largos estudios de observación mostraron una reducción del riesgo de las enfermedades crónicas con un elevado consumo de cereales. Sin embargo esta disminución no está vinculada al consumo del endosperma de cereales ni a las fibras aisladas, sino a la asociación de los polifenoles y de las fibras contenidas en los cereales completos. Se realizaron algunos estudios de intervención con el fin de determinar la sinergia de este efecto sobre marcadores asociados a las enfermedades crónicas. Los resultados confirmaron que los efectos beneficiosos resultan del consumo de cereales completos (no refinados) o de la asociación de los polifenoles y fibras.

- 15 Los recientes datos de la literatura muestran un interés creciente de los nutrientes y micronutrientes, en particular, especialmente de aquellos que poseen un alto poder antioxidante, presentes naturalmente en los cereales, pero que no están desgraciadamente ya presentes en la harina blanca.

Sería, por lo tanto, deseable poder proporcionar al consumidor productos alimentarios que incluyen estos nutrientes y micronutrientes.

- 20 Desgraciadamente, esto parece muy difícil, habida cuenta del hecho, en particular, que los productos alimentarios en cuestión deben no solamente responder de manera óptima a exigencias alimenticias bien precisas, sino deben al mismo tiempo presentar calidades texturales y organolépticas satisfactorias, siendo al mismo tiempo susceptibles de ser fabricados según procedimientos y parámetros operativos convencionales o poco modificados. Así, para no tomar más que este ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. recientemente publicada nº 2003/0104103 describe un procedimiento de preparación de productos alimentarios que contienen salvado, pero este procedimiento hace intervenir un tratamiento del salvado destinado a reducir su contenido en ácido ferúlico, en particular, para mejorar el gusto.

- 30 El documento de la solicitud de patente japonesa nº 62.236.453 describe productos de repostería que incluyen harina de salvado de arroz y que tiene buenas calidades de conservación y buenas propiedades nutritivas. El documento de la patente de EE.UU. nº 2.176.037 describe una nueva harina de cereales que tienen propiedades estabilizadoras. El artículo publicado en Biosciences information service, Philadelphia, PA, US; 1989 por Singh N et al, titulado *"Rheological and cookie making studies on wheat-rice flour blends"* describe cookies en que un 10% de harina de trigo se sustituyen por harina de arroz. El artículo publicado en International Food Information Service (IFIS), Frankfurt-Main, DE; por Nettles E M, titulado *"Functionality of oat-wheat composite flours in surgar-snap cookies: effect of method of milling, processing, oat cultivar, and wheat cultivar"* describe cookies que incluyen de 15 al 30% de harina de avena. Otro artículo publicado en el IFIS, Frankfurt-Main, DE; por Berglund PT et al, titulado *"food uses of waxy hull-less barley"* describe productos alimentarios en los cuales 25 a 100% de harina de trigo, de avena o de arroz son sustituidos por harina de cebada. El artículo de El-Latif Arma et al, también publicado en el IFIS, Frankfurt, titulado *"Using millet flour and sodium steryl-2-lactylate in the production of cookie from hard wheat flour"* describe distintas mezclas de harina de trigo y de mijo y su utilización en cookies. La publicación en el Diario of

the American College of Nutrition, vol. 19, n° 3, suppl. junio de 2000, páginas 312S -319S de Miller Harold et al, titulada "Antioxydant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables" describe el efecto antioxidante de harinas de arroz y de maíz. El artículo publicado en Biosciences information service, Philadelphia, PA, US; junio de 2000 por Zielinski H et al, titulado "Antioxydant activity and total phenolic in selected cereal grains and their different morphological fractions" enseña el efecto antioxidante de extracto acuoso de harina de alforfón. La publicación de Lloyd BJ et al, también publicada en el IFIS, Frankfurt, titulada "effects of commercial processing on antioxidant rice bran" describe la influencia de distintos procedimientos de molienda y de preparación sobre las propiedades antioxidantes de Salvado de arroz. Finalmente, siempre en el IFIS, Frankfurt, el artículo de So Young Bu et al titulado "Antioxydant activity and total phenolic compound in grain extracts of wheat, barley, and oat" enseña que los cereales ricos en fenoles presentan elevadas propiedades antioxidantes.

Ahora bien, es el mérito de la Sociedad Solicitante haber conseguido superar todos los prejuicios del estado de la técnica anterior y llegar a poner a punto un producto de cereales que responde a la vez a las exigencias nutricionales, texturales y organolépticas, que se puede fabricar, con algunas adaptaciones, en líneas de fabricación tradicionales, y que presentan una alta densidad nutricional así como un muy alto poder antioxidante, apto para aumentar el contenido de antioxidantes naturales en el intestino y en mejorar la resistencia del organismo al estrés oxidativo.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a un producto de cereales que posee una buena densidad nutricional, un alto poder antioxidante, un procedimiento para su fabricación, así como su utilización con el fin de aumentar la aportación en antioxidantes naturales y/o en vitaminas B1, B9, y/o en minerales: cinc, magnesio y selenio y/o en fibras; así como de prevenir los efectos nocivos vinculados al estrés oxidativo y a la decadencia de las funciones cognitivas e inmunitarias.

Por producto de cereales, se entiende según la invención cualquier producto alimentario que contiene una cantidad significativa de al menos una fracción de cereal o pseudocereal, que contiene por ejemplo al menos 10%, preferentemente al menos 20%, más preferentemente al menos 30% en peso de dicha fracción con respecto al peso de producto terminado. A título de ejemplos de productos de cereales, se pueden citar los productos de biscochería, los productos de panificación seca, los productos de tipo 'barra de cereales', los productos de tipo 'cereales para el desayuno'.

Por producto de biscochería, se entiende según la invención cualquier tipo de producto que contiene cereales, en particular, en forma de harina, de materia grasa y eventualmente de huevos, y que haya sido sometido a un tratamiento de cocción. Son por ejemplo las galletas, tales como las galletas secas, las galletas saladas, las galletas de tipo 'aperitivo', las galletas azucaradas, las galletas de pasta dura o semidura, los productos de repostería, las tartas, las magdalenas, las tartaletas, los bizcochos, las lenguas de gato, los barquillos, los productos de tipo 'snack', los crackers, etc

Por cereal o pseudocereal, se entiende según la invención cualquier planta cuyos granos sirven para la alimentación del hombre y de los animales omnívoros. Son, por ejemplo, el trigo, el centeno, la avena, la cebada, el arroz, el maíz, el mijo, el sorgo y el alforfón.

Por fracción de cereal o pseudocereal, se entienden cualquier producto o subproducto derivado de un cereal o de un pseudocereal. Son productos preferentemente obtenidos por tratamiento mecánico de los granos de dichos cereales o pseudocereales, por ejemplo, de los productos o coproductos de molinería o de molienda. Ejemplos son las harinas (por ejemplo harina de cola), el salvado (por ejemplo salvado fino, salvado grueso), los moyuelos (o productos de moyuelo) tales como los moyuelos blancos o los moyuelos bis, y los gérmenes.

Por poder antioxidante o, de manera equivalente, capacidad antioxidante, se entiende según la invención, la capacidad de una sustancia para inhibir o retrasar la oxidación de una molécula diana sujeta a un ataque esencialmente de tipo de radicales. Un ataque de tipo de radicales puede sobrevenir en distintas circunstancias, por ejemplo, en presencia de especies oxigenadas reactivas, tales como los radicales hidroxilo, los superóxidos, los radicales alcóxido y alquilperóxido, el oxígeno singlete. Estas especies de radicales pueden resultar, en particular, de la reducción incompleta del oxígeno en la cadena de transporte de los electrones.

Con el fin de evaluar un valor de poder antioxidante, se comparan generalmente el tiempo y/o el grado de inhibición de las reacciones de radicales provocadas por el componente estudiado con los de un antioxidante de referencia. En general la forma hidrosoluble de la vitamina E (Trolox) se toma como referencia. Se trata generalmente de un análisis cuantitativo global que no determina de manera específica la naturaleza de los antioxidantes en cuestión. Para este análisis, se pueden utilizar varios sistemas de producción de los radicales (hidroxilo, peróxido), así como varias moléculas dianas del ataque de los radicales. Se desarrollaron y se aplicaron varios procedimientos en base al poder antioxidante de extractos de alimentos o de fluidos biológicos. La Sociedad Solicitante eligió el método ORAC (acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity, capacidad de absorción de radicales de oxígeno, en español método CARO) ya que presenta múltiples ventajas para muestras alimentarias.

El método ORAC mide en el tiempo la pérdida de intensidad de fluorescencia de la fluoresceína en presencia de radicales peróxido y esto hasta la desaparición total de la fluorescencia. La presencia de compuestos antioxidantes

5 en la muestra inhibe la acción oxidante de los radicales libres hacia la sonda fluorescente, y el cálculo de la superficie bajo la curva (AUC) con respecto a un blanco permite, por lo tanto, la determinación cuantitativa relativa de la capacidad antioxidante de estos compuestos hacia los radicales libres. Esta técnica de cálculo informa sobre dos parámetros indicadores de la capacidad antioxidante: el tiempo de inhibición y el porcentaje de inhibición de la actividad oxidante de los radicales libres en presencia de antioxidantes.

$$\text{Capacidad antioxidante} = \text{AUC}_{\text{antioxidante}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}$$

$$\text{Valor ORAC relativo} =$$

$$\left[ \frac{\text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}}{\text{AUC}_{\text{std}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}} \right] \times \frac{\text{molaridad}_{\text{std}}}{\text{molaridad}_{\text{muestra}}}$$

10 Esta fórmula se aplica también para el análisis de compuestos antioxidantes puros de molaridades conocidas. En el caso de los productos de cereales según la invención, el parámetro molaridad (mol/L) es sustituido por valores expresados en g/L. El valor ORAC final se expresa entonces en  $\mu\text{mol}$  de Trolox (es decir, en Equivalentes de Trolox, o de TE) por gramo de materia seca. Este método es sensible, fiable y robusto. Es reproducible en el tiempo con un coeficiente de variación del método inferior al 15%, un límite de detección bajo equivalente a  $5 \mu\text{M}$  y un límite de cuantificación de  $12,5 \mu\text{M}$ . Es decir, que valores de capacidad antioxidante superiores a  $12,5 \mu\text{mole TE/g}$  son completamente fiables. En cambio, compuestos antioxidantes presentes entre 5 y  $12,5$  son detectables pero no cuantificables precisamente por este método.

15 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un producto de cereales de bizcochería o de panificación seca que contiene harina de trigo, caracterizado por que 20-40% en peso de harina de trigo se sustituyen por una fracción de cereal o pseudo cereal constituido por:

- 20 • 15-25% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz, o
- 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de harina de alforfón, o
- 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de moyuelos blancos de trigo, o
- 5-15% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz + 5-15% de gérmenes de trigo,

25 dicha fracción de cereal o de pseudocereal que representa 10-25% en peso con respecto al peso total de los ingredientes,

dicho producto de cereales que posee un alto poder antioxidante tal como se mide por el método ORAC superior o igual a 17,  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por gramo de producto terminado ( $\mu\text{mol TE/g}$ ), siendo dicho poder oxidante esencialmente aportado por la presencia como ingrediente de al menos una fracción de cereal o de pseudocereal.

30 Según un modo de realización preferido, dicho poder antioxidante tal como se mide por el método ORAC de los productos de cereales según la invención es superior o igual a 19, preferentemente superior o igual a 20, más preferentemente aún superior o iguales a  $25 \mu\text{mol TE/g}$ .

Según un modo de realización preferido, dicho producto de cereales contiene al menos 4, preferentemente al menos 5, más preferentemente aún al menos 5,5 Equivalente mg ácido gálico de polifenoles totales por gramo de producto de cereales deslipidado (Eq. mg ácido gálico /g).

35 Por el término polifenol, se entiende según la invención cualquier molécula que posee varias (i.e. al menos dos) funciones fenol.

40 Ventajosamente, dicho producto de cereales contiene al menos un polifenol elegido entre los flavonoides, en particular, la quercetina y la rutina, y los ácidos fenólicos, en particular, los ácidos hidroxi-benzoicos, los ácidos hidroxi-cinámicos, el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido vanílico, el ácido p-cumárico, el ácido sinápico, el ácido ferúlico y sus derivados esterificados tales como  $\gamma$ -orizanol, así como sus mezclas, siendo preferido el ácido ferúlico.

Según también un modo de realización preferido según la invención, dicho producto de cereales contiene:

- al menos 50, preferentemente al menos 90, más preferentemente aún al menos 100 mg de magnesio por 100 g de materia seca de producto terminado y/o
- 45 - al menos 0,8, preferentemente al menos 1,0, más preferentemente aún al menos 1,3 mg de cinc por 100 g de materia seca de producto terminado y/o
- al menos 1,0, preferentemente al menos 1,5, más preferentemente aún al menos 2,0  $\mu\text{g}$  de selenio por 100 g de materia seca de producto terminado.

Según un modo de realización preferido según la invención, dicho producto de cereales contiene:

- al menos 0,15, preferentemente al menos 0,20, más preferentemente aún al menos 0,30 mg de vitamina B1 por 100 g de producto terminado y/o
- al menos 40, preferentemente al menos 45, más preferentemente aún al menos 50 µg de vitamina B9 por 100 g de producto terminado.

5 De acuerdo con la invención, el producto de cereales presenta la ventaja de utilizar como principal fuente de poder antioxidante esencialmente al menos una fracción de cereal o pseudocereal. Ahora bien, tal fracción puede ventajosamente integrarse simplemente como ingrediente en la composición de dicho producto. Con el fin de obtener un alto poder antioxidante según la invención, generalmente no hay necesidad de utilizar fuentes distintas de las fracciones de cereales, aunque eso sigue siendo posible. Así, según la invención, no es estrictamente necesario hacer intervenir fuentes 'exógenas' de moléculas a las propiedades antioxidantes, como, por ejemplo, ácido ferúlico puro. Según la invención, la parte fundamental del poder antioxidante es aportada por la presencia de al menos una fracción de cereal o de pseudocereal naturalmente rico en polifenoles.

10 Dicho cereal o pseudocereal puede ser cualquier cereal conocido por el experto en la técnica, con tal que contribuye de manera esencial, por su presencia como ingrediente, a conferir al mencionado producto de cereales un poder antioxidante medido por el método ORAC (acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity) superior o igual a 17, preferentemente superior o igual a 19 µmol TE/g. Según un modo de realización preferido, dicho cereal o pseudocereal se elige entre el mijo, el arroz, el alforfón, la cebada, el maíz, la avena, el trigo, el sorgo y el maíz.

15 La fracción de cereal o pseudocereal puede ser cualquier fracción conocida por el experto en la técnica, en la medida en que su aportación como ingrediente confiere de manera esencial al mencionado producto de cereales un poder antioxidante medido por el método ORAC (acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity) superior o igual a 17, preferentemente superior o igual a 19 µmol TE/g. Según un modo de realización preferido, dicha fracción se elige entre la harina, el salvado, los moyuelos y los gérmenes, así como sus mezclas. Preferentemente, dicha fracción se elige entre el germen de trigo, los moyuelos de trigo, en particular, los moyuelos blancos de trigo, la harina de alforfón, el salvado de arroz, así como sus mezclas.

20 Ventajosamente, de acuerdo con la invención, dicha fracción de cereal o pseudocereal contiene:

- al menos 50, preferentemente al menos 100, más preferentemente aún al menos 150 mg de magnesio por 100 g de fracción y/o
- al menos 1,0, preferentemente al menos 2,0, más preferentemente aún al menos 4,0 mg de cinc por 100 g de fracción y/o
- al menos 3,0, preferentemente al menos 4,0, más preferentemente aún al menos 5,0 µg de selenio por 100 g de fracción.

25 Ventajosamente según la invención, dicha fracción de cereal o pseudocereal contiene:

- al menos 0,5, preferentemente al menos 1,0, más preferentemente aún al menos 1,5 mg de vitamina B1 por 100 g de fracción y/o
- al menos 0,5, preferentemente al menos 1,0, más preferentemente aún al menos 1,5 mg de vitamina B6 por 100 g de fracción y/o
- al menos 40, preferentemente al menos 50, más preferentemente aún al menos 60 µg de vitamina B9 por 100 g de fracción y/o
- al menos 2, preferentemente al menos 4, más preferentemente aún al menos 6 mg de vitamina E por 100 g de fracción.

30 De manera preferente, dicha fracción de cereal o pseudocereal tiene un contenido en polifenoles totales superior o igual a 5,0, preferentemente superior o igual a 6,0, más preferentemente aún superior o igual a 8,0 Eq mg Ácido Gálico/g de fracción de cereales.

35 Preferentemente, también según la invención, dicha fracción de cereal o pseudocereal presenta un poder antioxidante tal como se mide según el método ORAC superior o igual a 30, preferentemente superior o igual a 40 µmol TE/g. De manera aún más preferida, dicha fracción de cereal o pseudocereal presenta un poder antioxidante tal que se mide según el método ORAC superior o igual a 50, preferentemente 80 µmol TE/g.

40 Dicho producto de cereales según la invención es un producto de bizcochería o de panificación seca que contienen harina de trigo. Por ejemplo, dicho producto de cereal se elige preferentemente entre las galletas, tales como las galletas secas, las galletas saladas, las galletas de tipo 'aperitivo', las galletas azucaradas, las galletas de pasta dura

o semidura, los productos de repostería, las tartas, las magdalenas, los bizcochos, las lenguas de gato, los barquillos, los productos de tipo 'snack', los crackers, etc

5 Según un modo de realización especialmente ventajoso, cuando la harina blanca está presente como ingrediente en el tipo de producto de cereales contemplado por la invención, una proporción de dicha harina blanca es sustituida por al menos una fracción de cereal y/o de pseudocereal, lo que contribuye, total o parcialmente, a conferir al mencionado producto de cereales un poder antioxidante medido por el método ORAC (acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity) superior o igual a 17, preferentemente superior o igual a 19  $\mu\text{mol TE/g}$ . Preferentemente 10-50%, preferentemente 15-45%, y más preferentemente aún 20-40% en peso de harina de trigo convencionalmente presente es sustituido por al menos una fracción de cereal o pseudocereal, de tal modo que dicho producto de cereales posee un poder antioxidante medido por el método ORAC (acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity) superior o igual a 17, preferentemente superior o igual a 19  $\mu\text{mol TE/g}$ .

Según la presente invención, 20-40% en peso de harina de trigo es sustituido por:

- 15-25% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz, o
- 15 - 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de harina de alforfón, o
- 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de moyuelos blancos de trigo, o
- 5-15% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz + 5-15% de gérmenes de trigo.

De manera especialmente preferida, 30% en peso de harina de trigo son sustituidos por:

- 20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz, o
- 20 - 20% de salvado de arroz + 10% de harina de alforfón, o
- 20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo, o
- 10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% de gérmenes de trigo.

25 En el marco de la invención, se utiliza 10-25%, preferentemente 12-22%, más preferentemente aún 15-20%, y aún más preferentemente 17-19% en peso con respecto al peso total de los ingredientes, de al menos una fracción de cereal o pseudocereal según la invención.

Además, el producto de cereales según la invención puede contener ingredientes o aditivos convencionales. Por estos términos, se entiende según la invención todo producto que se puede utilizar convencionalmente en la elaboración de un producto de cereales. Estos ingredientes y aditivos pueden ser, por ejemplo, en particular, azúcar, edulcorantes, frutos secos, emulgentes (lecitina de soja), potenciadores de sabor, aromas, colorantes, gasificantes (bicarbonato de sodio, bicarbonato de amonio, fosfato monocálcico, etc), materias grasas tales como los aceites alimentarios (de colza, de almendra, de palma, etc), huevos y productos derivados, los productos lácteos (por ejemplo leche en polvo) y sal de mesa. Preferentemente, las materias grasas se pueden seleccionar de modo que, en los ácidos grasos poliinsaturados, la proporción de ácidos grasos esenciales presenta una relación  $\omega 6/\omega 3 \leq 5$ , que el contenido en ácidos grasos trans esté a nivel de traza, y que sean libres de materias grasas hidrogenadas. Por este objetivo, la elección de un aceite de colza no hidrogenado se indica especialmente. El aceite de colza es en efecto conocido por reequilibrar la dieta occidental actual que incluye una relación  $\omega 6/\omega 3$  en torno a 20 ya que su baja relación (2 – 2,5) permite acercarse a las recomendaciones alimenticias actuales (5). Por otra parte, una buena aportación en  $\omega 3$  se reconoce por tener un papel inmunomodulador y contribuir a la disminución de las lesiones de aterosclerosis al reducir la respuesta de las placas a la agregación. El consumo de aceite de colza causaría también una reducción de la fibrilación ventricular a raíz de una isquemia.

Según un modo de realización preferido, el producto de cereales según la invención puede por otro lado contener al menos una fruta, en particular, bayas, por ejemplo frutos rojos frutos secos (almendras, avellanas, nuez, albaricoques secos, etc), chocolate, o un extracto de té verde.

45 Según un modo de realización, uno o varios de los ingredientes pueden proceder de la agricultura biológica, en particular, los ingredientes de origen de cereales.

Los productos de cereales conformes a la invención se pueden presentar bajo distintas formas conocidas por el experto en la técnica. Las dimensiones de dichos productos se pueden incluir entre 20-100 mm, estando el espesor generalmente comprendido entre 2-90 mm. Dichos productos pueden por otra parte incluir un recubrimiento y/o un forraje, pepitas de chocolate o fruta, un dorado y/o un decorado. Se acondicionan preferentemente bajo embalaje, por ejemplo en bolsitas que contienen de 1 a 10 unidades, por ejemplo representando un poder antioxidante deseado, y teniendo un peso total determinado.

5 Gracias a la selección y al respeto de las características antes citadas, el producto de cereales según la invención posee un excelente nivel nutricional, propiedades organolépticas elevadas, y permite aumentar la aportación en antioxidantes naturales y/o en vitaminas B1, B9, y/o en minerales: cinc, magnesio y selenio y/o en fibras; así como en prevenir los efectos nocivos vinculados al estrés oxidativo t de la decadencia de las funciones cognitiva e inmunitaria, en particular en el sujeto humano, evitando al mismo tiempo cualquier toxicidad. Un consumo regular de los productos de cereales según la invención contribuye eficazmente a aumentar la resistencia del organismo ante el estrés oxidativo y sus efectos nocivos, garantizando al mismo tiempo una total inocuidad, en la medida en que los ingredientes elegidos son completamente naturales y que el poder antioxidante resulta esencialmente de fracciones de cereal o pseudocereales, i.e. de fracciones inicialmente destinadas al consumo en el marco de la alimentación humana. Así, los productos de cereales según la invención aportan beneficios en cuanto a la salud humana, sin por 10 ello acompañarse de los posibles riesgos vinculados a una sobredosis.

Los productos de cereales según la invención poseen también buenas calidades organolépticas: su textura es agradable, y su gusto es aceptable como mínimo.

15 Finalmente, los productos de cereales según la invención demuestran una excelente estabilidad durante varios meses, lo que es una ventaja por supuesto, esencial en cuanto al almacenamiento y la distribución.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un producto de cereales. Según la invención, dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- selección de los ingredientes,
- mezcla de dichos ingredientes, en una o varias operaciones, en particular, en una artesa,
- 20 - elaboración de dicho producto, en particular, por moldeo por rotación, recorte con rotorecortador después laminado, aglomeración, extrusión, coextrusión, colado de la pasta sobre bandas sólidas o en moldes de cocción,
- facultativamente cocción y/o facultativamente enfriamiento, y
- facultativamente embalaje,

25 incluyendo dichos ingredientes al menos una fracción de cereal y/o al menos una fracción de pseudocereal. Tal procedimiento permite obtener los productos de cereales según la invención. Las etapas de mezcla, elaboración, cocción y enfriamiento, embalaje se conocen perfectamente por el experto en la técnica.

Una etapa de cocción no es generalmente deseada en el caso en que dicho producto de cereales sea de tipo "barra de cereales" o una preparación que el consumidor debe cocinar.

30 Las tecnologías de elaboración o de conformado, convencionales, conducen, en particular, a pastas laminadas, laminadas hojaldradas, y recortadas, o pastas rotativas o corte al hilo.

Ejemplos de procedimientos utilizables según la invención son los siguientes:

1/ Procedimiento de cereales de las pastas azucaradas: galletas

35 Las materias primas mayoritarias son la harina, las materias azucaradas, las materias grasas. Se mezclan con otros ingredientes tales como el agua, la sal, gasificantes,... en una artesa. Esta etapa, generalmente denominada amasado, resulta en la formación de una pasta. La consistencia de esta pasta determina generalmente su paso por la línea de fabricación.

40 Si esta pasta está ligada (red garantizada por las proteínas), y forma un bloque de pasta, después de un tiempo de reposo variable, puede ser elaborada por cilindros de laminado de tal manera que forme una banda de pasta, generalmente de 1 a 2 mm de espesor. Puede a continuación ser recortada, por un cilindro rotorecortador, con la forma y con las dimensiones de las galletas deseadas. Se obtienen, por lo tanto, pastas denominadas laminadas y recortadas.

45 Si esta pasta es cohesiva pero parece algo menos ligada, ésta se puede reducir con la ayuda de un desmenuzador, introducida a continuación en una tolva, luego moldeada con las formas y dimensiones de la galleta deseada por compresión de la pasta entre el cilindro acanalado y el cilindro de moldeo. El desmoldeo de las galletas se efectúa en general por presión del cilindro "espuma" sobre el cilindro de moldeo. Son pastas denominadas rotativas.

Si esta pasta no tiene cohesión, si es pegajosa, se puede enderezar en el corta hilo que recortará trozos de pasta. Son pastas denominadas al corte de hilo.

50 Estas pastas se pueden dorar a continuación, luego se cocinarán en un horno. Sacadas del horno, las galletas se enfriarán antes de su acondicionamiento.

2/ Procedimiento de las pastas neutras o saladas:

Las materias primas mayoritarias son la harina, el agua, un ingrediente activo siguiendo los procedimientos (enzima o levadura o agente gasificante).

5 Estos ingredientes se mezclan, en parte (carcker fermentado) o en su totalidad. Se les pone a fermentar durante un tiempo variable de 1 a 24 horas, a temperatura ambiente, o caliente según el procedimiento. La pasta se lamina, y eventualmente se hojaldra luego se recorta por un rotorecortador con las dimensiones y formas de la galleta deseada. Los crackers se cocinan a continuación, y se pulverizan eventualmente de materia grasa y se aromatizan, luego a continuación se enfrían y se acondicionan. Son pastas denominadas laminadas o laminadas hojaldradas y recortadas.

10 Ventajosamente, la sustitución de una porción de la harina blanca por fracciones de cereal o pseudocereales según la invención no requiere modificación del procedimiento de fabricación con respecto a una galleta a base de harina blanca solamente, y se puede así adaptar sobre líneas de fabricación usuales.

15 Según un modo de realización preferido, dichos ingredientes incluyen al menos una fracción de cereal o pseudocereal, preferentemente elegido entre el germen de trigo, los moyuelos blancos de trigo, la harina de alforfón, el salvado de arroz y sus mezclas.

Dicho producto de cereales según la invención es un producto de bizcochería o de panificación seca que contiene harina de trigo y 20-40% en peso de harina de trigo que se sustituyen por:

- 15-25% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz, o
- 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de harina de alforfón, o
- 20 - 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de moyuelos blancos de trigo, o
- 5-15% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz + 5-15% de gérmenes de trigo.

De manera aún más preferente, alrededor del 30% en peso de harina de trigo son sustituidos por:

- 20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz, o
- 20% de salvado de arroz + 10% de harina de alforfón, o
- 25 - 20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo, o
- 10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% de gérmenes de trigo.

30 Finalmente, en otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un producto de cereales tal como se describe anteriormente, o se obtiene por el procedimiento divulgado en la presente solicitud, con el fin de aumentar la aportación en antioxidantes naturales y/o en vitaminas B1, B9, y/o en minerales: cinc, magnesio y selenio y/o en fibras; así como de prevenir los efectos nocivos vinculados al estrés oxidativo y de la decadencia de las funciones cognitivas e inmunitarias.

**EJEMPLOS DE REALIZACIÓN**

**EJEMPLO 1: Procedimientos de dosificación de los polifenoles**

Muestras

35 Las muestras de fracciones de cereales se almacenaron a -18°C antes del análisis.

Las maquetas, embaladas se pusieron en estufa a 20°C bajo 50% de higrometría para no estar sometidas a envejecimiento acelerado.

Patrones

Los distintos patrones de ácidos fenólicos se obtuvieron en Sigma-Aldrich, bajo las siguientes referencias:

- 40 - Ácido gálico: Sigma G7384
- + (-) Catequina hidrato: Fluka 22120
- Ácido OH benzoico: Fluka 54630
- Ácido Vanílico: Sigma V2250

- Ácido p-Cumárico: Sigma C9008
  - Ácido o-Cumárico: Fluka 28170
  - Ácido ferúlico: Sigma F3500
  - Ácido sinápico: Sigma: D7927
- 5
- Rutina trihidrato: Fluka 84082
  - Quercetina dihidrato: Fluka F83370

#### Productos químicos

El conjunto de los productos químicos es de calidad analítica.

- NaOH
- 10
- HCl
  - Metanol
  - Carbonato de sodio
  - Reactivo de Folin-Ciocalteu: Fluka 47641

#### Preparación de la muestra

- 15
- Antes de cualquier operación, las fracciones de cereales y las maquetas se trituran y se homogenizan. Las maquetas deslipadas con la ayuda de hexano antes de la etapa de extracción.

#### Extracción de los ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos han sido extraídos según 2 protocolos:

- Ácidos fenólicos totales, que permiten una extracción global,
- 20
- Ácidos fenólicos en función de su solubilidad, que permite una extracción de los ácidos fenólicos hidrosolubles, metanolo-solubles, e insolubles.

#### Extracción de los ácidos fenólicos totales.

Hidrólisis según el siguiente protocolo:

- Hidrólisis con la ayuda de NaOH 2M, 1 noche a 35°C (1g en 20 ml)
- 25
- Puesta a pH 2 con HCl 6M
  - Centrifugación de 26895 g (15000 rpm) durante 20 minutos
  - Recuperación de sobrenadante

#### Extracciones de los polifenoles solubles

Extracciones secuenciales en una estufa al refugio de la luz y bajo agitación según el siguiente protocolo:

- 30
- Extracción del hidrosoluble en el agua a 50°C (2g en 20 ml)
  - Extracción de los metanolo-solubles en metanol/agua 80/20 a 70°C (sedimento en 20 ml)
  - Hidrólisis de cada una de las partes solubles obtenidas con la ayuda de NaOH tal como para la hidrólisis de los ácidos fenólicos totales (5 ml de parte en 20 ml de NaOH)

#### Extracción de los polifenoles insolubles

- 35
- Hidrólisis idéntica a la de los ácidos fenólicos totales sobre el sedimento resultante de la extracción de los polifenoles solubles. (sedimento +30 ml NaOH)

#### Cuantificación

La cuantificación se efectuó según 2 protocolos:

- Colorimetría que permite una cuantificación global de los ácidos fenólicos
- HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia) que permite la cuantificación de cada uno de los ácidos fenólicos

Dosificación por colorimetría

- 5 La cantidad de polifenoles se determina siguiendo el protocolo de Folin-Ciocalteu. La coloración azul desarrollada por la oxidación de los ácidos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu (o reactivo de Folin) se mide a 760 nm y se calcula la concentración utilizando una gama patrón de ácido gálico a 40 mg/100 ml de agua.

En tubos de ensayo	Gama patrón						Muestra	
Solución madre ml	0	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	/	/
Muestra ml	/	/	/	/	/	/	0,5	1
Agua ml	7,00	6,95	6,90	6,80	6,70	6,60	6,50	7,00
Desencadenar un cronómetro en el momento de la introducción del 1º ml de reactivo Folin								
Reactivo de Folin ml diluido al ½	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
A los 3 minutos introducir la 1ª adición de carbonato de sodio								
Carbonato de sodio 20% ml	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Tapar los tubos y mezclarlos con la ayuda de un vórtex (vortexear)								
Desarrollo de la coloración durante 30 minutos								
Lectura a 760 nm contra el blanco								

Los resultados se expresan en equivalente mg ácido gálico/g (Eq mg ácido gálico/g) de producto empleado.

- 10 La diferente respuesta de los ácidos fenólicos (dependiente de su composición) así como la no especificidad del reactivo de Folin (interacción de las proteínas y azúcares reductores) explica la diferencia observada entre los resultados de las distintas extracciones (la suma de las fracciones no es siempre igual a los polifenoles totales).

Dosificación por cromatografía líquida en fase inversa y detección UV (HPLC - PDA)

Esta técnica permite cuantificar los distintos ácidos fenólicos presentes.

- 15 Cada una de las fracciones obtenidas ha sido previamente filtrada sobre columna SPE (Extracción en Fase Sólida) de tipo Oasis HLB 6cc (0,2 g) Waters, que permite una purificación de la muestra así como una concentración de los distintos ácidos fenólicos.

Protocolo de utilización de las columnas SPE:

- Acondicionamiento: 4 ml de metanol luego 4 ml de agua
- 20 - Carga con 6 ml de extracto
- Lavado 1 con 6 ml de una solución compuesta de 90 ml de ácido fórmico a 2% y 10 ml de metanol
- Lavado 2 con 2 ml de una solución compuesta de 70 ml de ácido fórmico a 2% y 30 ml de metanol
- Elución con 3 veces 2 ml de una solución compuesta de 10 ml de amonio hidróxido a 2% y 90 ml de metanol
- 25 - Evaporación al vacío a 60°C
- Recuperación del extracto seco en 1 ml de eluyente A de las condiciones HPLC.

Los extractos solubilizados han sido filtrados sobre Acrodisc GVWP 0,22 µm, luego inyectados en HPLC-PDA.

Cromatografía HPLC-PAD:

## ES 2 464 793 T3

- Utilización de un sistema HPLC Alliance Waters 2695 XE asociado a un detector de red de diodos PDA 996
  - Columna: Hypersil ODS Agilent 5µm 200 x 2,1 mm 799160D-572 (Interchim)
  - Precolumna: del mismo tipo.
  - Eluyente A: 100 ml metanol + 10 ml ácido fórmico c.s.p. 1 l de agua milíQ
- 5
- Eluyente B: 10 ml ácido fórmico c.s.p. 1 l de metanol
  - Filtración de los eluyentes sobre membranas GVWP 0,22 µm

### Condiciones de gradiente:

	Tiempo min	Caudal ml/min	% Eluyente A	% Eluyente B
1	0	0,30	95	5
2	1,30	0,30	95	5
3	2,70	0,30	80	20
4	18,70	0,30	80	20
5	32,00	0,30	50	50
6	45,00	0,30	30	70
7	47,00	0,30	0	100
8	67,00	0,30	0	100
9	72,00	0,30	95	5
10	77,00	0,30	95	5

Temperatura columna: 25°C

10 Temperatura muestra: 10°C

Volumen de inyección: 20 µl

La detección y la identificación de los ácidos fenólicos se efectúan por medida de la absorbancia a 280 nm y comparación con espectros de referencia obtenidos a partir de soluciones patrones.

15 La cuantificación (en mg/100 g) por calibrado externo con la ayuda de soluciones patrones permite calcular los distintos factores de respuesta en el ámbito de concentración de las muestras.

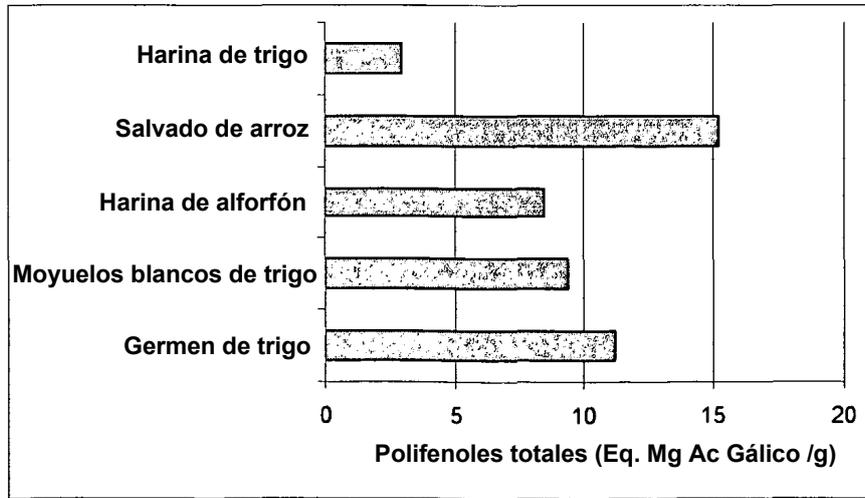
La cuantificación del contenido en minerales, fibras y vitaminas siguientes ha sido realizada según los métodos mencionados más abajo:

- Mg: Método CEE 73/46
  - Zn: Método CEE 78/633
- 20
- Se: Método ETAAS
  - Fibras totales: Método AOAC 1997
  - Vit E: Método NF V18-402 – HPLC
  - Vit B1 y B6: Método JORF 04/02/1999 – HPLC
  - Vit B9 total: Método de Microbiología.

### 25 **EJEMPLO 2: Propiedades nutricionales de las fracciones de cereales y pseudocereales según la invención**

Contenido en polifenoles de las fracciones según la invención

Comparadas a la harina blanca de trigo, las fracciones de cereales según la invención poseen contenido en polifenoles aproximadamente de 3 a 5 veces más elevados:



Contenido en moléculas fenólicas de las fracciones

5 Tal como lo muestran las tablas siguientes, un análisis profundo de la calidad de las moléculas fenólicas contenidas en las fracciones de cereales según la invención permitió identificar los principales polifenoles presentes.

10 Así, la catequina está presente principalmente en el salvado de arroz, el ácido vanílico en el germen de trigo (preferentemente en la parte insoluble), el ácido p-cumárico en el salvado de arroz, y el ácido ferúlico se encuentra principalmente en las fracciones de trigo (germen y moyuelos) así como en el salvado de arroz. Se presenta también más abajo una tabla más detallada, con las concentraciones en moléculas fenólicas en la extracción hidrosoluble y la extracción no soluble en agua.

**Tabla 2**

**Contenido total en polifenoles de las fracciones según la invención:**

Fracción	Capacidad antioxidante total Método ORAC (µmol TE/g)	Polifenoles Totales (Eq.mg Acido gálico/g)
Germen de trigo	106	11,15
Moyuelos blancos de trigo	49	9,35
Harina de alforfón	81	8,48
Salvado de arroz	121	15,24

**Tabla 3**

**Contenido en polifenoles de las fracciones según la invención (mg/100 g)**

<b>Fracciones</b>	<b>Catequina</b>	<b>Ac. P-OH-benzoico</b>	<b>Ac. Vanílico</b>	<b>Ac. P-cumárico</b>	<b>Ac. Sinápico</b>	<b>Ac. Ferúlico</b>	<b>Quercetina</b>	<b>Rutina</b>	<b>γ-orizanol</b>
Germen de trigo	0	1,26	13,73	0	0	81,57	0,174	3,94	ND
Moyuelos blancos	0	1,04	1,32	0,74	0	86,89	ND	ND	ND
Harina de alforfón	1,27	0,78	1,82	0,37	0,45	0,51	2,42	11,85	ND
Salvado de arroz	5,37	0	1,93	20,19	4,73	80,94	ND	ND	4,03
Harina blanca	0,03	1,26	0	1,71	4,01	2,95	ND	ND	ND

**ND = No determinado**

**Tabla 4**

**5 Contenido en polifenoles de la parte hidrosoluble de las fracciones según la invención (mg/100 g):**

<b>Fracción</b>	<b>Parte hidrosoluble</b>							
	<b>Catequina</b>	<b>Ac. P-OH-benzoico</b>	<b>Ac. Vanílico</b>	<b>Ac. P-cumárico</b>	<b>Ac. Sinápico</b>	<b>Ac. Ferúlico</b>	<b>Quercetina</b>	<b>Rutina</b>
Germen de trigo	0	0,27	0,541	0	0	25,97	0,174	3,94
Moyuelos blancos de trigo	0	1,039	0,86	0,056	0	23,83	ND	ND
Harina de alforfón	1,082	0	1,815	0,205	0	0,423	2,42	11,85
Salvado de arroz	2,037	0	1,934	1,281	4,729	11,749	ND	ND

Tabla 5

Contenido en polifenoles de la parte insoluble de las fracciones según la invención (mg/100 g):

Fracción	Parte insoluble								
	Ac. gálico	Catequina	Ac. P-OH-benzoico	Ac. Vanílico	Ac. P-cumárico	Ac. Sinápico	Ac. Ferúlico	Quercetina	Rutina
Germen de trigo	0	0	0,991	13,19	0	0	55,6	ND	ND
Moyuelos blancos de trigo	0	0	0	0,462	0,684	0	63,063	ND	ND
Harina de alforfón	0,486	0,187	0,778	0	0,161	0,451	0,086	ND	ND
Salvado de arroz	0	3,336	0	0	18,912	0	69,188	ND	ND

5 Es importante tener en cuenta que la harina blanca tiene por regla general concentraciones demasiado bajas en moléculas fenólicas, lo que confirma el interés nutricional de las fracciones según la invención. Una mezcla de fracciones según la invención da entonces ventajosamente un amplio abanico a la gama de polifenoles durante la fabricación de las galletas.

La Fig 1 presenta el contenido en vitaminas B1, B6, B9 y E de las fracciones de cereales utilizadas de acuerdo con la invención.

10 La Fig 2 presenta el contenido en Mg, Se, Zn de las fracciones de cereales utilizadas según la invención.

La Fig 3 presenta el poder antioxidante ORAC y el contenido en polifenoles totales de las fracciones de cereales utilizadas según la invención.

### **EJEMPLO 3: Medida del poder antioxidante de los polifenoles puros según el método ORAC**

Tabla 6

15 Poder antioxidante de polifenoles según el método ORAC ( $\mu\text{mol TE/g}$ ):

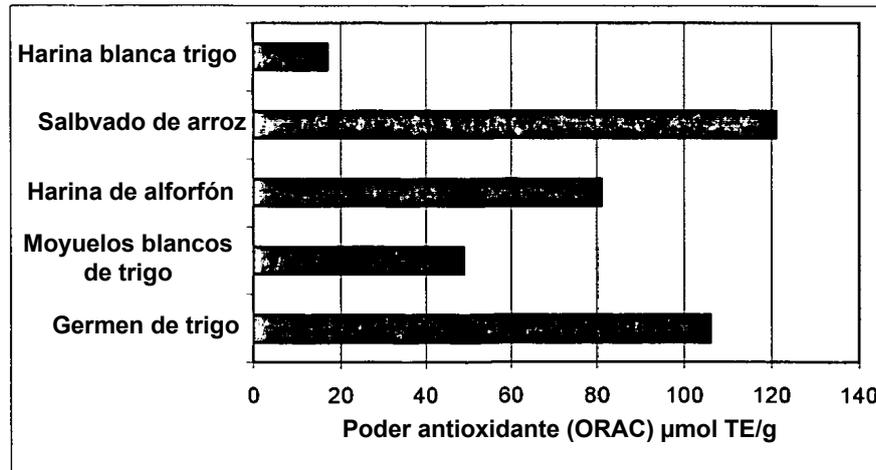
Polifenoles	ORAC
Ácido ferúlico	3,77 +/- 0,10 (3)
Quercetina	4,38 +/- 0,22 (3)
Rutina	4,28 +/- 0,25 (3)
Orizanol	3 +/- 0,26 (2)

Fuente: (1) 208/id; (2) 40/id; (3) 1602/id

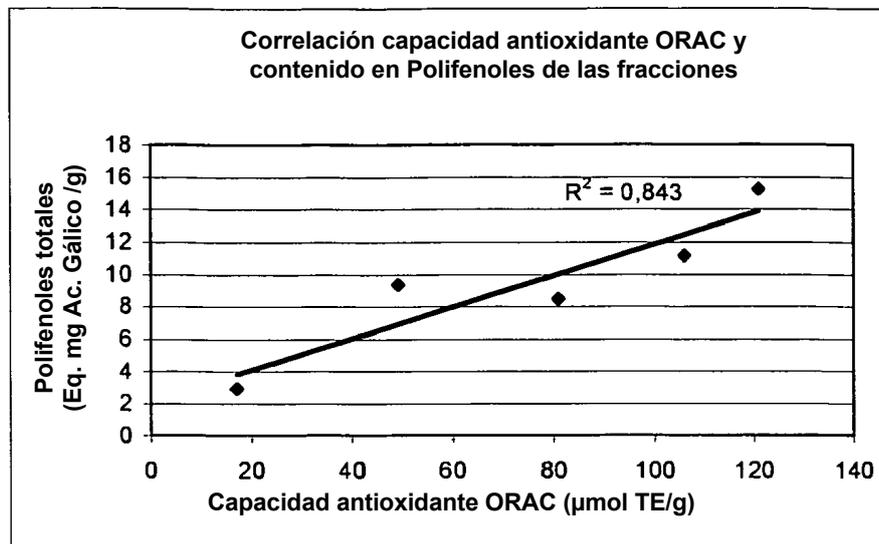
ORAC = acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity

### **EJEMPLO 4: Poder antioxidante de las fracciones de cereales según la invención**

20 El contenido importante de moléculas fenólicas presentes en las fracciones les confiere también un poder antioxidante (ORAC) mucho más importante que el de la harina blanca.



Esta capacidad antioxidante de las fracciones se correlaciona bien con su contenido en polifenoles totales.



**EJEMPLO 5:** Preparación de productos de bizcochería según la invención

5 Elección de los ingredientes

Tabla 7

Descripción de mezclas de las fracciones y códigos de productos:

Código producto	Descripción del contenido de las fracciones (% de fracciones en sustitución de la harina blanca)
OC 38/ CO 48	estándar Laminado recortado 5 (OC) o Rotativo (CO)
OC 39/ CO 49	20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz
OC 40/ CO 50	20% de salvado de arroz + 10% de harina de alforfón
OC 41/ CO 51	20% de harina de alforfón + 10% de moyuelos blancos de trigo
OC 42/ CO 52	20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo
OC 43/ CO 53	10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% de gérmenes de trigo

Elaboración de las galletas, densidad, dimensiones

5 La invención va a ser ilustrada con ejemplos sobre pastas azucaradas de productos de cereales donde se mezclan, de acuerdo con la invención, con harina de trigo estándar de las fracciones de cereales. Los resultados tecnológicos obtenidos sobre los ensayos de laboratorio, según la tecnología Laminado-Recortado o la tecnología Rotativo, de fabricación de galletas se comparan entonces con los resultados obtenidos con la harina denominada “estándar” (harina de trigo estándar).

En todos los casos, la sustitución parcial de la harina de trigo blando por una de las fracciones o una mezcla de algunas de estas fracciones permite ventajosamente según la invención la fabricación de galletas sin modificación de los otros ingredientes de la receta y/o del procedimiento de fabricación.

Protocolo de preparación para la tecnología laminada recortada:

10 El conjunto de las harinas y fracciones de cereales se mezcla en la artesa.

Luego se añaden los distintos azúcares, la materia grasa. Todo ello se amasa unos instantes, luego se añaden los gasificantes y el agua. El conjunto se amasa de 4 a 12 minutos. Tras el reposo, la pasta se lamina y se recorta con las formas y dimensiones de las galletas. Los trozos de pasta se cocinan a continuación en un horno a una temperatura entre 250 y 300°C con pérdida en agua constante para obtener galletas de 1 a 3% de humedad.

15 Protocolo de preparación para la tecnología rotativa:

20 El conjunto de los azúcares, materia grasa, y gasificantes se mezcla en la artesa en caso de lo que se puede llamar el cremado. Luego se añaden las distintas harinas y fracciones de cereales. El conjunto se amasa de 4 a 12 minutos. Tras el reposo, la pasta se moldea y se deposita en las formas y dimensiones de las galletas. Los trozos de pasta se cocinan a continuación en un horno a una temperatura entre 250 y 300°C con pérdida en agua constante para obtener galletas de 1 a 3% de humedad.

Tecnología Laminado-Recortado:

Las composiciones siguientes son ejemplos de galletas azucaradas fabricadas según la invención utilizando la tecnología Laminado-Recortado.

**Tabla 8**

25 **Recetas de galletas según la invención para la tecnología Laminada Recortada:**

Ingredientes (g)	OC 38	OC 39	OC 40	OC 41	OC 42	OC 43
Harina de trigo	288,54	198,56	197,28	199,67	197,10	197,03
Harina de alforfón	0	56,73	28,18	57,05	0	28,15
Salvado de arroz	0	28,37	56,37	0	56,31	28,15
Moyuelos blancos	0	0	0	28,52	28,16	0
Gérmenes de trigo estabilizados	0	0	0	0	0	28,15
Azúcar glas	34,44	34,44	34,44	34,44	34,44	34,44
Azúcar invertido	22,51	22,51	22,51	22,51	22,51	22,51
Jarabe de glucosa	82,36	82,36	82,36	82,36	82,36	82,36
Copra	47,41	47,41	47,41	47,41	47,41	47,41
Bicarbonato de sodio	1,81	1,81	1,81	1,81	1,81	1,81
Ácido cítrico	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
Pirofosfato de sodio	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51
Bicarbonato de amonio	4,04	4,04	4,04	4,04	4,04	4,04
Agua	17,98	22,86	24,69	21,27	24,95	25,04
TOTAL (g)	499,99	499,99	499,99	499,99	499,99	499,99

Las dimensiones de las galletas no muestran diferencias significativas con el estándar. Las densidades medidas para los productos de bizcochería según la invención no son significativamente diferentes de las del ensayo estándar (ensayo OC 38), tal como lo muestran los resultados sobre la figura 4, en la parte de arriba.

Tecnología Rotativa:

- 5 Las composiciones siguientes son ejemplos de galletas azucaradas fabricadas según la invención utilizando la tecnología "Rotativa".

**Tabla 9**

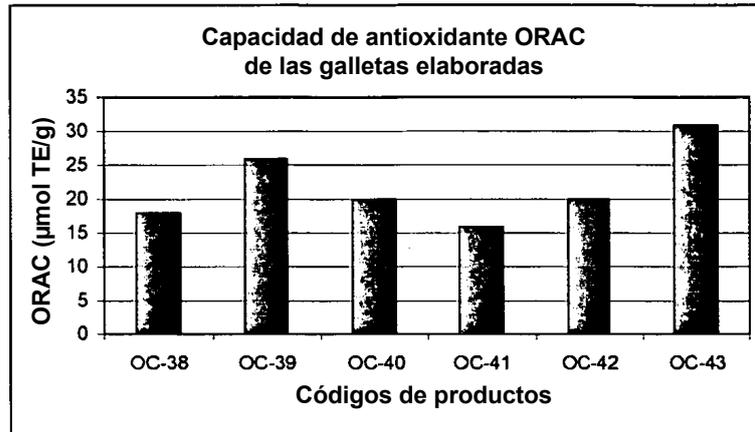
**Recetas de galletas según la invención para la tecnología Rotativa:**

<b>Ingredientes (g)</b>	<b>CO 48</b>	<b>CO 49</b>	<b>CO 50</b>	<b>CO 51</b>	<b>CO 52</b>	<b>CO 53</b>
Harina de trigo	738,70	508,39	505,11	511,23	504,47	504,36
Harina de alforfón	0	145,25	72,16	146,06	0	72,05
Salvado de arroz	0	72,63	144,32	0	144,13	72,05
Moyuelos blancos	0	0	0	73,03	72,07	0
Gérmenes de trigo estabilizados	0	0	0	0	0	72,05
Azúcar glas	171,00	171,00	171,00	171,00	171,00	171,00
Jarabe de glucosa	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00
Copra	162,00	162,00	162,00	162,00	162,00	162,00
Bicarbonato de sodio	3,06	3,06	3,06	3,06	3,06	3,06
Bicarbonato de amonio	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Sal	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
Lecitina	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17
Agua	89,1	101,5	106,2	97,5	107,1	107,3
<b>TOTAL (g)</b>	<b>1200,13</b>	<b>1200,10</b>	<b>1200,12</b>	<b>1200,15</b>	<b>1200,10</b>	<b>1200,14</b>

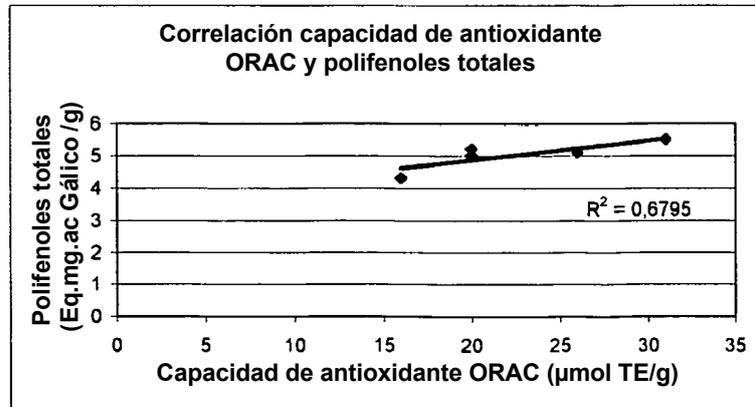
- 10 Las dimensiones de las galletas no muestran diferencias significativas con el estándar. Las densidades medidas no son significativamente diferentes de las del ensayo estándar (ensayo CO-48), tal como lo muestran los resultados en la figura 4, en la parte baja.

**Poder antioxidante de los productos de bizcochería según la invención**

- 15 La capacidad antioxidante de las galletas según la invención muestra los valores sensiblemente más elevados que para la galleta estándar.



Existe una buena correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido en polifenoles totales.



5 El contenido en polifenoles, vitaminas y minerales de las galletas que contienen las fracciones seleccionadas es más elevado que en la galleta estándar (harina blanca) (véase tabla 10).

**Tabla 10**

**Poder antioxidante ORAC y contenido en polifenoles totales, vitaminas y minerales de las galletas según la invención elaboradas según dos tipos de tecnología**

		ORAC total	Polifenoles totales	Vitaminas		Minerales		
				B1	B9	Zn	Mg	Se
<b>Tecnología Laminada</b>								
OC 38	estándar laminado recortado	18	3,34	0,06	25	0,3	15	1,29
OC 39	20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz	26	5,09	0,19	35	0,8	91	2,03
OC 40	20% de salvado de arroz + 10% alforfón	20	5,2	0,28	61	1,1	130	1,45
OC 41	20% de harina de alforfón + 10% de moyuelos blancos de trigo	16	4,31	0,16	42	0,8	46	2,3
OC 42	20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo	20	5,01	0,33	54	1,3	125	1,13
OC 43	10% de harina de alforfón + 10% salvado de arroz + 10% gérmenes de trigo estabilizados	31	5,51	0,22	53	1,9	91	1,46

**Tabla 10 (sigue)**

<b>Tecnología Rotativa</b>								
CO 48	estándar (rotativa)	10	2,96	0,06	35	0,5	15	1,45
CO 49	20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz	17	5,1	0,22	39	1	91	2,28
C50	20% de salvado de arroz + 10% alforfón	20	5,54	0,32	46	1,3	130	1,63
CO 51	20% de harina de alforfón + 10% de moyuelos blancos de trigo	18	4,62	0,17	41	1	47	2,58
C52	20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo	19	5,33	0,37	43	1,5	127	1,27
CO 53	10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% Gérmenes de trigo estabilizados	19	5,07	0,29	51	1,9	93	1,63

Unidades:

5 ORAC total (µmol TE/g)

Polifenoles totales (UMA) Eq. mg Ac.Gálico/g

Vitamina B1 (mg/100g), Vitamina B9 (µg/100g)

Zn (mg/100g), Mg (mg/100g), Se (µg/100g)

**Tabla 11 Contenido en fibras de las galletas según la invención**

		Contenido en fibras (g/100g)
<b>Tecnología laminada</b>		
OC 38	estándar laminado recortado	3,4
OC 39	20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz	4
OC 40	20% de salvado de arroz + 10% alforfón	5,3
OC 41	20% de harina de alforfón + 10% de moyuelos blancos de trigo	3,9
OC 42	20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo	6,7
OC 43	10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% gérmenes de trigo estabilizados	4,7
<b>Tecnología rotativa</b>		
CO 48	estándar (rotativa)	2,6
CO 49	20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz	4,4
C50	20% de salvado de arroz + 10% alforfón	5,6
CO 51	20% de harina de alforfón + 10% de moyuelos blancos de trigo	3,5
C52	20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo	6,1
CO 53	10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% Gérmenes de trigo estabilizados	3,8

Tabla 12

Contenido en polifenoles de galletas según la invención elaboradas según dos tipos de tecnologías

		Perfil polifenoles totales en mg/100 g							
		Catequina	Ac. P-OH-benzoico	Ac. Vanílico	Ac. P-cumárico	Ac. Sinápico	Ac. Ferúlico	Rutina	Orizanol
<b>Tecnología laminada</b>									
OC 39	20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz	2,10	3,60	3,50	1,90	4,30	8,20	2,31	ND
OC 40	20% de salvado de arroz + 10% alforfón	3,38	5,60	0,00	3,34	7,32	13,12	1,04	ND
OC 42	20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo	2,80	7,70	3,70	3,60	10,70	17,00	ND	40,17
OC 43	10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% gérmenes de trigo estabilizados	5,66	0,00	0,00	2,03	12,83	9,45	1,35	19,05
<b>Tecnología rotativa</b>									
CO 49	20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz	0,60	2,30	3,60	1,70	4,80	8,40	0,47	0,24
C50	20% de salvado de arroz + 10% alforfón	0,00	0,00	0,00	3,10	14,10	10,10	0,24	0,48
C52	20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo	0,60	3,00	1,00	3,20	13,90	16,10	ND	0,48
CO 53	10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% Gérmenes de trigo estabilizados	0,00	0,00	0,40	1,50	12,60	10,00	0,95	0,24

5 **EJEMPLO 6: Efecto de una suplementación con el germen de trigo y con la harina de alforfón sobre parámetros de la función inmunitaria, del sistema antioxidante y del estrés oxidativo en un ratón joven prematuramente envejecido**

El envejecimiento se considera como un proceso progresivo e irreversible con acumulación de cambios funcionales que pueden aumentar el riesgo de incidencia de enfermedades y de muerte.

10 Más de 300 teorías se propusieron para explicar el proceso de envejecimiento y a pesar del hecho de que ninguna de ellas no sea completamente consensual actualmente, la teoría denominada “de radicales libres” o especies reactivas del oxígeno (ROS = acrónimo de la expresión inglesa Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)) propuesta por Harman (Harman D. Free radical theory of aging. Triangle; 1973; 12: 153-8.) sigue siendo la más aceptada. Según esta teoría, los radicales libres y sus derivados son responsables de los daños celulares mediante la oxidación de las moléculas estructurales de la célula (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) con consecuencia de las alteraciones funcionales.

15 El envejecimiento se acompaña de un desequilibrio entre la producción de ROS y el nivel de antioxidantes en favor de los radicales, una situación conocida bajo el nombre de estrés oxidativo (Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. Neurobiology of aging 2002; 23: 795-807. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free radical biology & medicine 2002; 33: 575-86.)

Algunas células son más o menos sensibles al estrés oxidativo. Las células inmunitarias, por ejemplo, son muy vulnerables a un desequilibrio de la balanza antioxidantes/oxidantes, ya que solamente un nivel adecuado de antioxidantes permite a la célula inmunitaria estar en un medio reductor, protegido contra el estrés oxidativo y así conservar cualquiera de su funcionalidad.

5 La relación entre función inmunitaria y antioxidantes resulta cada vez más evidente y recientes trabajos ponen de manifiesto que una suplementación en antioxidantes puede tener un efecto beneficioso en algunas condiciones (Grimble RF. Nutritional modulation of immune function. The Proceedings of the Nutrition Society 2001; 60: 389-97. Meydani SN, Beharka AA. Vitamin E and immune response in the aged. Bibliotheca nutritio et dieta 2001; 148-58. Moriguchi S, Muraga M. Vitamin E and immunity. Vitamins and hormones; 2000; 59,305-36. Meydani M. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. Mechanisms of ageing and development 1999; 111: 123-32. Beck MA. Selenium and host defence towards viruses. The Proceedings of the Nutrition Society 1999; 58: 707-11. Hughes DA. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. The Proceedings of the Nutrition Society 1999; 58: 79-84. de la FM, Ferrández MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel-J. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. Canadian journal of physiology and pharmacology 1998; 76: 373-80.).

20 Por otra parte, datos científicos confirman que el envejecimiento se asocia, por una parte a un estrés oxidativo más importante, y por otra parte a una decadencia de diversas funciones fisiológicas, más concretamente a una pérdida de homeostasia de la función inmunitaria, lo que se correlaciona a una más importante incidencia de enfermedades infecciosas y de algunos cánceres en los sujetos de edad (Burns EA, Leventhal EA. Aging, immunity, and cancer. Cancer control 2000; 7: 513-22.).

Las principales modificaciones de la función inmunitaria identificadas durante el envejecimiento se resumen en la tabla siguiente:

**Tabla 13**

**Principales efectos del envejecimiento sobre la función inmunitaria**

Células	Función	Modificación
Fagocitos	Adherencia	Aumento
	Migración	Disminución
	Fagocitosis	Disminución
	Producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS)	Aumento
	Producción de TNF- $\alpha$	Aumento
	Producción de IL-1	Aumento
Linfocitos	Adherencia	Aumento
	Migración	Disminución
	Proliferación	Disminución
	Producción de IL-2	Disminución
células NK	Citotoxicidad	Disminución

25 Las células inmunitarias, más concretamente los fagocitos, ejercen su citotoxicidad mediante la producción de las especies reactiva del oxígeno. Sin embargo, una cantidad excesiva de ROS que no llega a ser frustrada por el sistema antioxidante implica la instalación de un estrés oxidativo que puede ser nociva, ya que los ROS atacan los componentes de la célula que implica su muerte. Un buen funcionamiento del sistema antioxidante es, por lo tanto, vital para las células inmunitarias.

30 El efecto de dos fracciones de cereales naturalmente ricas en nutrimentos y en polifenoles se evaluó durante 5 luego 15 semanas (ejemplo 7), sobre varios parámetros de la función inmunitaria, de producción de ROS, y del estrés oxidativo de los leucocitos, en un modelo de ratón joven prematuramente envejecido (Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, de la FM. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. Journal of

neuroimmunology 2001; 114: 80-8. FM, Miñano M, Manual V, V et al. Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study. Mechanisms of ageing and development 1998; 102: 263-77.).

5 La evaluación del efecto del germen de trigo (fracción B) y la harina de alforfón (fracción C) sobre parámetros de la función inmunitaria, de la producción de ROS y del estrés oxidativo en un modelo de ratón joven prematuramente envejecido ha sido realizada, por lo tanto, del siguiente modo.

**Animales:**

10 Para este estudio se preseleccionó a 90 ratones hembras OF1 Swiss (Mus musculus) (Harlan Ibérica Spain) de una edad de 3 meses para este estudio. Se marcó a cada ratón a la llegada al laboratorio para ser seguido a lo largo de todo el estudio. Se colocaron los ratones en jaulas de poliuretano a una temperatura constante de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y con un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12/12 horas. Se trataron a todos los animales de acuerdo con las directivas 86/6091 EEC de la Comunidad Europea.

**Grupos experimentales:**

15 Se han clasificado los ratones inicialmente en grupos, en función de su rendimiento durante 4 evaluaciones al ensayo T-shape maze (de la FM, Minano M, Manual V, V et al. Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study. Mechanisms of ageing and development 1998; 102: 263-77). Así se clasificaron 44 ratones como ratones lentos (rendimiento de más de 10 segundos), se clasificaron 30 ratones como rápidos (rendimiento menor de 10 segundos) y otros no se incluyeron en este estudio ya que no respondieron de manera homogénea a las 4 evaluaciones. Según este modelo, los ratones denominados lentos corresponden a ratones prematuramente envejecidos (PAM - Prematurely-Aging Mice) y los rápidos a no prematuramente envejecidos (NPAM - Non Prematurely-Aging Mice). Así se subdividieron los 44 ratones PAM y 30 ratones NPAM en 20 3 grupos para una suplementación del siguiente modo:

**Tabla 14**

**Grupos de ratones para la experimentación**

30 NPAM (Non Prematurely-Aging Mice)	30 Ratones Controles (testigos)	NPAMc
44 PAM (Prematurely-Aging Mice)	12 Ratones Controles	PAMc
	16 Ratones suplementados con un régimen que contiene 20% de germen de trigo (Fracción B)	PAM-B
	16 Ratones suplementados con un régimen que contiene 20% de harina de alforfón (Fracción C)	PAM-C

25 **Muestras biológicas y marcadores:**

Se obtuvieron algunas muestras de leucocitos del peritoneo, a 5 semanas desde el principio de la suplementación, sin sacrificar los animales, según la técnica descrita por De la Fuente et al (de la FM, Miñano M, Manual V, V et al Relation between exploratory activity and immune function in aged mice: a preliminary study. Mechanisms of ageing and development 1998; 102: 263-77). Los marcadores utilizados para evaluar la función inmunitaria son los siguientes:

- Adherencia, quimiotaxia, fagocitosis y producción de ROS intracelular (producción de anión superóxido  $\text{O}_2^-$ ) de macrófagos: método según De la Fuente et al de la FM, Del Rio M, Ferrández MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrofages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. Immunology 1991; 205-11.)
- 35 ➤ Adherencia y proliferación de linfocitos: método descrito por Del Rio et al (Del Rio M, Herranz A, de la FM. Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinasa C. Peptides 1994; 15: 15-22.)
- 40 ➤ Adherencia, quimiotaxia, proliferación de linfocitos y producción de IL-2: método descrito por Del Rio et al (Del Rio M, Hernanz A, de la FM. Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. Peptides 1994; 15: 15-22.) y Guayerbas et al (Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, de la FM. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. Experimental gerontology 2002; 37: 249-56).

- Citotoxicidad de las células 'Natural Killer' (NK): método descrito por Ferrández et al (Ferrández MD, de la FM. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. Acta physiologica Scandinavica 1999; 166: 47-53.)

Los marcadores para evaluar la producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS) son:

- 5
- Producción de anión superóxido ( $O_2^\ominus$ ): método descrito en Victor et al (Victor VM, Guayerbas N, Garrote D, Del Rio M, de la FM. Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. BioFactors 1999; 10: 347-57.).
- 10
- Producción de citoquinas por los leucocitos TNF- $\alpha$  (Victor VM, de la FM. Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related to the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. Physiological research 2003; 52: 101-10.).
- 15
- Producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), de prostaglandina PGE2 y de óxido nítrico (NO) (Molina HF, Hernanz A, de la FM, Guaza C. N-Acetylcysteine inhibition of encephalomyelitis Theiler's virus induced nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha production by murine astrocyte cultures. BioFactors 1999; 187-93. Connelly L., Jacobs A. T., Palacios-Callender M., Moncada S., Hobbs A. Macrophage endothelial nitric oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expresión. J. Biol. Chem. 2003).

La actividad de las enzimas antioxidantes se evaluó también: superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GPX) y Catalasa (CAT), así como el sistema glutación según la descripción en Victor et al (Victor VM, de la FM.)

Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related to the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. Physiological research 2003; 52: 101-10).

- 20
- Con el fin de determinar los daños oxidativos sobre los lípidos, también se midió el contenido en malondialdehído (MDA), según la técnica descrita por Chirico et al (Chirico S., Smith C., Marchant C., Mithison M. J., Halliwell B. Lipid peroxidation in hyperlipemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. Free. Radic Res. 1993; 19: 51-57).

#### **Análisis estadístico**

- 25
- Se expresan todos los valores por término medio  $\pm$  desviación tipo (media). Los ensayos de Kolmogorov-Smimov y Levene se utilizaron para determinar la normalidad de los datos y la homogeneidad de las variaciones. Los análisis entre grupos suplementados y grupos de control fueron realizados por t-Student y ANOVA. Las comparaciones de dos en dos fueron realizadas por el ensayo de Tukey. La significatividad estadística ha sido ensayada en bilateral y se expresa en:  $\alpha$   $p < 0,05$ ,  $\alpha\alpha$   $p < 0,01$  y  $\alpha\alpha\alpha$   $p < 0,001$  para las diferencias entre los grupos de control de los NPAM y PAM y en \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  para las diferencias entre grupos suplementados y sus correspondientes controles PAM por nivel de edad.
- 30

#### **Resultados**

La información presentada en las tablas siguientes corresponde solamente a las modificaciones estadísticamente significativas de distintos marcadores después de la suplementación.

- 35
- A. efecto de las fracciones sobre la función inmunitaria de los ratones jóvenes prematuramente envejecidos

Se restauran una serie de parámetros modificados durante el envejecimiento en ratones jóvenes después de la suplementación con las fracciones. (Véase tablas siguientes).

Leyenda de las tablas:

NS no significativo

- 40
- V Aumento del parámetro después de la suplementación con el régimen según la invención

↪ Parámetro que disminuye durante la edad

#### **Tabla 15**

**Efecto de una suplementación durante 5 semanas con 20% de fracciones de cereales según la invención sobre la función inmunitaria de los ratones jóvenes prematuramente envejecidos**

Parámetros	Poblaciones	Resultados	Cambio con la edad
Índice de adherencia de macrófagos	PAM-B	NS	V
	PAM-C	NS	
Índice de quimiotaxia de los macrófagos	PAM-B	NS	↔
	PAM-C	V	
Índice de fagocitosis	PAM-B	V	↔
	PAM-C	NS	
Índice de eficacia de fagocitosis	PAM-B	NS	↔
	PAM-C	V	
Índice de adherencia de linfocitos	PAM-B	↔	V
	PAM-C	NS	
Índice de quimiotaxia de los linfocitos	PAM-B	NS	↔
	PAM-C	NS	
Limfoproliferación en respuesta a la Con-A	PAM-B	NS	↔
	PAM-C	V	
Limfoproliferación en respuesta al LPS	PAM-B	NS	↔
	PAM-C	V	
Producción de TNF $\alpha$	PAM-B	NS	V
	PAM-C	NS	
Producción de PGE2	PAM-B	↔	V
	PAM-C	↔	

B. Efecto de las galletas sobre la producción de ROS y los antioxidantes endógenos de los ratones jóvenes prematuramente envejecidos

5 La suplementación con el germen de trigo y con la harina de alforfón no bloquea la producción de radicales libres después de estímulo con PMA (Phorbol Myristate Acetate), disminuye el estrés oxidativo aumentando el conjunto de marcadores endógenos del sistema antioxidante (tabla siguiente).

**Tabla 16**

**Efecto de una suplementación durante 5 semanas con 20% de fracciones B y C sobre la producción de ROS y los niveles de antioxidantes endógenos de los ratones jóvenes prematuramente envejecidos**

10

Parámetros	Población	Resultados
Nivel extracelular basal de anión superóxido	PAM-B	NS
	PAM-C	NS
Nivel intracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> después del estímulo (PMA)	PAM-B	V
	PAM-C	V
Producción de NO	PAM-B	NS

Parámetros	Población	Resultados
	PAM-C	NS
Actividad del Superóxido dismutasa	PAM-B	V
	PAM-C	NS
Actividad del Glutación peroxidasa	PAM-B	V
	PAM-C	V
Actividad de la Catalasa	PAM-B	V
	PAM-C	V
Actividad del Glutación reductasa	PAM-B	V
	PAM-C	V
Concentración en Glutación total	PAM-B	V
	PAM-C	V
Concentración en Glutación reducido	PAM-B	V
	PAM-C	V
Concentración en Glutación oxidado	PAM-B	∩
	PAM-C	∩
GSSG/GSH	PAM-B	∩
	PAM-C	∩
Malondialdehído	PAM-B	NS
	PAM-C	∩

Los detalles de los resultados se presentan en las figuras 5-12.

Las figuras 5-12 describen el efecto del régimen suplementado (5 semanas) según la invención sobre las funciones inmunes de los leucocitos peritoneales de ratones jóvenes PAM y NPAM.

- 5 La Fig 5 representa el índice de adherencia (A.I.) y de quimiotaxia (C.I.) de macrófagos peritoneales de hembras de ratón suizas. Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado PAMc (n = 8), PAM-B y PAM-C (n = 6). aa p < 0,01 y aaa p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo NPAM. \*\* p < 0,01 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.
- 10 La Fig 6 representan la eficacia fagocitaria P.E. (número de macrófagos fagocitantes/100 macrófagos, P.E.) e índice fagocitario P.I. (número de partículas de látex ingeridas por 100 macrófagos, P.I.) de macrófagos peritoneales de hembras de ratón suizas. Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado. PAMc (n = 8), PAM-B y PAM-C (n = 6). \*\* p < 0,01 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.
- 15 La Fig 7 representa la producción no estimulada y estimulada (bolas de látex) de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) intracelular por macrófagos peritoneales de hembras de ratón suizas. Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado. PAMc (n = 7), PAM-B y PAM-C (n = 6). a p < 0,05 y aa p < 0,01 con respecto a los valores del grupo testigo NPAM. \*\* p < 0,01 y \*\*\* p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.
- 20 La Fig 8 representa la producción de ROS no estimulada y estimulada (PMA) y porcentaje (%) de estímulo en respuesta a PMA por macrófagos peritoneales de hembras de ratón suizas. Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado. PAMc (n = 10), PAM-B y PAM-C (n = 11). a p < 0,05 aa p < 0,01 y aaa p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo NPAM. \* p < 0,05 y \*\*\* p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.

La Fig 9 representa el índice de adherencia (A.I.) e índice de quimiotaxia (C.I.) de linfocitos peritoneales de hembras de ratón suizas.

Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado. PAMc (n = 8), PAM-B y PAM-C (n = 6) para el ensayo de adherencia; PAMc (n = 8), PAM-B (n = 8) y PAM-C (n = 6) para el ensayo de quimiotaxia. aaa p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo NPAM. \*\* p < 0,01 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.

La Fig 10 representa la proliferación basal, proliferación estimulada por Con A, y proliferación estimulada por LPS por linfocitos peritoneales de hembras de ratón suizas. Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado. PAMc (n = 10), PAM-B y PAM-C (n = 8). a p < 0,05 con respecto a los valores del grupo testigo NPAM. \*\* p < 0,01 y \*\*\* p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.

La Fig 11 representa el porcentaje (%) de estímulo en respuesta a Con A y porcentaje de estímulo en respuesta a LPS por linfocitos peritoneales de hembras de ratón suizas. Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado. PAMc (n = 10), PAM-B y PAM-C (n = 8). aa p < 0,01 y aaa p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo NPAM. \*\* p < 0,01 and \*\*\* p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.

La Fig 12 representa la producción de IL-2 y actividad 'natural killer' por linfocitos peritoneales de hembras de ratón suizas. Las columnas representan el valor medio +/- desviación tipo para experimentos realizados por duplicado. PAMc (n = 8), PAM-B y PAM-C (n = 10) para la producción de IL-2; PAMc (n = 6), PAM-B y PAM-C (n = 6) para la actividad 'natural killer'. aaa p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo NPAM. \*\* p < 0,01 y \*\*\* p < 0,001 con respecto a los valores del grupo testigo PAM.

### Conclusiones de este estudio

1. **Los ratones prematuramente envejecidos (PAM) presentan una decadencia de la función inmunitaria.**

Según nuestros resultados, la mayoría de los parámetros de la función inmunitaria medidos en los ratones jóvenes prematuramente envejecidos (PAM) muestran valores inferiores con respecto a los ratones no prematuramente envejecidos (NPAM), mientras que los dos grupos tienen la misma edad cronológica. Estos datos confirman por una parte, la decadencia de la función inmunitaria que acompaña el envejecimiento, y por otra parte el interés de nuestro modelo de envejecimiento.

2. **Una suplementación con el germen de trigo y con la harina de alforfón permite restaurar algunas funciones del sistema inmunitario que declinan durante el envejecimiento.**
3. **Las suplementaciones con el germen de trigo y con la harina de alforfón causan un aumento significativo de todos los componentes antioxidantes endógenos medidos (Glutatión total, Glutatión reducido y actividad de las 4 enzimas antioxidantes).**
4. **La suplementación con el germen de trigo y con la harina de alforfón previene el estrés oxidativo de los leucocitos.**

Una menor fuga de ROS hacia el exterior de la célula acompañada de una mejora del sistema antioxidante es el garante de una disminución del estrés oxidativo (GSSG, malondialdehído e la relación GSSG/GSH disminuidos después de la suplementación) así como menores daños oxidativos de la célula.

### **EJEMPLO 7: Efecto de una suplementación (15 semanas) con el germen de trigo y con la harina de alforfón sobre parámetros de la función inmunitaria, del sistema antioxidante y del estrés oxidativo en el ratón adulto prematuramente envejecido**

Se procedió como más arriba en el ejemplo 6, después de 15 semanas de suplementación, y se obtuvieron resultados similares. Este ejemplo permite reforzar las conclusiones del ejemplo 6 del siguiente modo:

5. **La suplementación con el germen de trigo y con la harina de alforfón tiene un mejor efecto sobre los parámetros estudiados cuando la duración de suplementación es larga (15 semanas), en comparación con la suplementación sobre 5 semanas.**
6. **La suplementación con harina de alforfón parece tener un mejor efecto sobre los parámetros estudiados cuando la duración de suplementación es corta (5 semanas). Después de un período de suplementación más largo, la suplementación con el germen de trigo o con la harina de alforfón tiene un efecto similar, a la vez cuantitativo y cualitativo sobre los parámetros.**

**EJEMPLO 8: Efecto de una suplementación con el germen de trigo, con la harina de alforfón, con el salvado de arroz y con los moyuelos de trigo sobre parámetros de la función inmunitaria, del sistema antioxidante y del estrés oxidativo.**

5 En el estudio anterior, se puso de manifiesto que la suplementación con el germen de trigo y con la harina de alforfón tenía un efecto beneficioso sobre la función inmunitaria y el sistema antioxidante endógeno de ratones jóvenes prematuramente envejecidos. Dado que el sistema inmunitario se considera hoy en día como un marcador de longevidad, se puede, por lo tanto, esperar que los ratones suplementados tengan una esperanza de vida más larga.

10 En este ejemplo, se utilizaron, además del germen de trigo y la harina de alforfón, otras dos fracciones interesantes por su calidad alimenticia (salvado de arroz y moyuelos de trigo). Los ensayos realizados en este estudio se hacen en un ratón sano durante el envejecimiento (estrés oxidativo crónico) y en un segundo momento en un ratón tras un estrés oxidativo agudo provocado por un choque endotoxínico. La segunda parte de este estudio permite evaluar el efecto de la suplementación con el germen de trigo, con la harina de alforfón, con el salvado de arroz y con los moyuelos de trigo sobre la supervivencia de los ratones.

15 **Muestras biológicas y marcadores:**

Los análisis realizados se refieren a las mismas funciones que las de los ejemplos 6 y 7, y se efectúan según el mismo protocolo a 5 y 20 semanas desde el principio de la suplementación. No obstante son menos numerosas:

- 20 ➤ La medida de los parámetros de la función inmunitaria se hace también sobre los macrófagos y los linfocitos y los marcadores medidos son la quimiotaxia, los niveles de ROS intracelulares, la proliferación y la producción de IL-2.
- Los parámetros del estrés oxidativo estudiados son los compuestos oxidantes (ROS extracelulares, el Glutatión oxidado (GSSG) y mediadores pro-inflamatorios: TNF $\alpha$  y PGE2) y los marcadores del sistema antioxidante (nivel de glutatión reducido (GSH) y actividad de la catalasa (CAT)).
- Les daños oxidativos sobre los lípidos son medidos por el nivel de malondialdehído (MDA).

25 Los animales de control reciben un régimen estándar (100%), y los animales suplementados reciben un régimen que incluye 80% del régimen estándar y 20% de una de las fracciones de cereales.

30 En los animales que fueron sometidos a un estrés oxidativo crónico (ratones sanos envejecidos), las muestras del peritoneo se toman después de 5 y 20 semanas de suplementación. En los ratones que fueron sometidos a un estrés oxidativo agudo (choque endotóxico), las muestras se toman después de 20 semanas de suplementación, antes del choque, luego 2 horas y 24 horas después del choque.

**Conclusiones de este estudio**

1. La suplementación con el germen de trigo, con la harina de alforfón, con el salvado de arroz y con los moyuelos de trigo permite restaurar algunas funciones del sistema inmunitario en el ratón sano durante el envejecimiento.
- 35 2. La suplementación con el germen de trigo, con la harina de alforfón, con el salvado de arroz y con los moyuelos de trigo permite neutralizar el estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de los ratones sanos durante el envejecimiento, aumentar los marcadores del sistema antioxidante, disminuir los compuestos oxidantes e inflamatorios y por lo tanto disminuir el estrés oxidativo así como los daños oxidativos sobre los lípidos.
- 40 3. La suplementación con el germen de trigo, con la harina de alforfón, con el salvado de arroz y con los moyuelos de trigo tiene un mejor efecto sobre los parámetros estudiados cuando se hace con una duración larga, en los ratones sanos.
- 45 4. En una corta duración, la suplementación de la dieta con la harina de alforfón y con los moyuelos de trigo tiene el mejor efecto en los ratones sanos durante el envejecimiento. Al contrario, con un período más largo (20 semanas), el efecto de las fracciones de cereal es idéntico sobre los distintos parámetros estudiados.
- 50 5. La administración de una endotoxina (LPS) implica una fuerte activación de algunos parámetros sobre los leucocitos del peritoneo, que se traduce en un estado de inflamación y de oxidación. Este estrés oxidativo leucocitario podría ser un factor importante en la degradación del estado general de estos animales, conduciéndolos a la muerte.
6. La suplementación con el germen de trigo, con la harina de alforfón, con el salvado de arroz y con los moyuelos de trigo restablece este estado, que conduce en la mayoría de los casos a valores similares a los de los controles sin endotoxemia.

7. Es difícil diferenciar los efectos de las fracciones de cereales entre sí.

**EJEMPLO 9: Efecto de una suplementación con galletas ricas en polifenoles sobre parámetros de la función inmunitaria del sistema oxidante y del estrés oxidativo en un ratón adulto durante el envejecimiento.**

5 Se efectuaron ensayos similares a los realizados en el ejemplo 8 (a 5, 15 y 30 semanas), pero utilizando productos de cereales según la invención, en la especie de galletas.

Los ensayos se realizaron con las galletas Referencias CO49, CO50, CO52 y CO53 descritas en la tabla 12 del ejemplo 5.

10 Los resultados obtenidos son de la misma naturaleza que los resultados anteriormente observados con la utilización de las fracciones de cereales según la invención, mientras que los productos de cereales sufrieron las etapas de transformación necesarias para su realización.

**EJEMPLO 10: Medida de la actividad antitumoral del germen de trigo, de la harina de alforfón, del salvado de arroz y de los moyuelos de trigo en el ratón.**

**Animales:**

15 Se preseleccionaron 200 ratones masculinos Swiss, de 2 meses de edad (100 por fase experimental) para este estudio. Los ratones han sido colocados en jaulas (4 por jaula) con un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12/12 horas y han sido aclimatados durante 7 días antes del inicio del estudio. El agua del grifo y la comida se proporcionaron *ad libitum*. Se trataron a todos los animales de acuerdo con las directivas 86/6091 EEC de la Comunidad Europea.

Se ensayaron las fracciones siguientes:

- 20 - Germen de trigo (fracción B),
- Harina de alforfón (fracción C),
- Salvado de arroz (fracción D),
- Moyuelos de trigo (fracción E).

**Grupos experimentales:**

Se repartieron los animales en 10 grupos, cada uno compuestos de 20 animales:

- 25 ➤ Grupo de control: 20 ratones alimentados con un régimen estándar (AIN-93).

Composición de la dieta AIN-93 (Panlab, Barcelona, España). Todos los animales de control reciben exclusivamente esta dieta

Nutrientos	Composición en mg/kg
Calorías <sup>a</sup>	2906,7
Proteínas <sup>b</sup>	153
Lípidos <sup>b</sup>	28,3
Vitamina A	2997
Niacina	91
Piridoxina	5,5
Vitamina E	17
Acido fólico	0,6
Magnesio	1440
Hierro	166
Cinc	79
Selenio	0,2

a: en kcal/kg; b: en g/kg

- Grupo de control + N-Nitrosodietilamina (NDEA): 20 ratones alimentados con un régimen estándar (AIN-93) y suplementados en nitrosamina (0,4 µg/j/ratón, diluida en agua).
- Grupo B: 20 ratones alimentados con 20% de la fracción de cereal B y 80% del régimen estándar (AIN-93).
- 5 ➤ Grupo B + NDEA: 20 ratones suplementados en nitrosamina (0,4 µg/j/ratón, diluida en agua) y alimentados con 20% de la fracción de cereal B y 80% del régimen estándar (AIN-93).
- Grupo C: 20 ratones alimentados con 20% de la fracción de cereal C y 80% del régimen estándar (AIN-93).
- Grupo C + NDEA: 20 ratones suplementados en nitrosamina (0,4 µg/j/ratón, diluida en agua) y alimentados con 20% de la fracción de cereal C y 80% del régimen estándar (AIN-93).
- 10 ➤ Grupo D: 20 ratones alimentados con 20% de la fracción de cereal D y 80% del régimen estándar (AIN-93).
- Grupo D + NDEA: 20 ratones suplementados en nitrosamina (0,4 µg/j/ratón, diluida en agua) y alimentados con 20% de la fracción de cereal D y 80% del régimen estándar (AIN-93).
- Grupo E: 20 ratones alimentados con 20% de la fracción de cereal E y 80% del régimen estándar (AIN-93).
- 15 ➤ Grupo E + NDEA: 20 ratones suplementados en nitrosamina (0,4 µg/j/ratón, diluida en agua) y alimentados con 20% de la fracción de cereal E y 80% del régimen estándar (AIN-93).

**Muestras biológicas y marcadores:**

Para el examen de los órganos y de las muestras, los ratones son sacrificados por una anestesia con dióxido de carbono seguido de una dislocación cervical, a 12 meses del principio de la suplementación. Las muestras tomadas son:

- 20 ➤ Extracción sanguínea
- Extracción hepática
- Extracción del ganglio mesentérico
- Extracción del intestino (10 cm).

25 Los marcadores utilizados para evaluar *in vivo* el efecto de las distintas fracciones de cereales B, C, D, E, después de 6 y 12 semanas de suplementación, sobre varios parámetros metabólicos y fisiológicos del hígado y del intestino son los siguientes: Las actividades de las fosfatasas alcalinas procedentes de los tejidos intestinales y hepáticos por el método de Kuffinec y Miller (Kuffinec, MM. and Miller, SA. Alkaline and acid phosphatase activities during growth of long bones and mandibles. Calcif. Tissue Res. 1972; 9: 173-178).

- 30 ➤ El estrés oxidativo por el cociente GSH/GSSG con los métodos de Tietze (Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized Glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem. 1969; 27(3): 502-22) y Sacchetta et al, (Sacchetta, P., Di Cola, D. and Federici, G. Alkaline hydrolysis of N-ethylmaleimide allows a rapid assay of Glutathione disulfide in biological samples. 1986).
- Estudios de las criptas aberrantes en los ratones que hayan recibido la nitrosamina.

35 **Análisis estadísticos:**

Los datos son analizados por un análisis de variación de un factor. Cuando los análisis de variación muestran una diferencia significativa entre los grupos ( $f$  ensayo  $< 0,05$ ), se hacen entonces varias comparaciones con el ensayo de Dunnett's comparando a cada grupo con el grupo de control.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  con respecto al grupo de control correspondiente por nivel de edad.

40 Los resultados obtenidos son los siguientes:

**A. Efecto de la suplementación con las cuatro fracciones de cereales ensayadas (B, C, D y E) sobre la actividad de las fosfatasas alcalinas en ratones jóvenes**

45 Las fosfatasas alcalinas hepáticas e intestinales son sensibles al buen funcionamiento del hígado y del intestino. La suplementación durante 6 y 12 semanas con las fracciones de cereales B y C disminuye su funcionamiento en los ratones sanos. En cambio, estas enzimas siendo muy sensible, su actividad se estimula en los ratones que hayan recibido la nitrosamina a 12 semanas y que hayan recibido las fracciones de cereales B, D y E.

**Efecto de una suplementación durante 6 semanas con 20% de fracciones de cereales naturalmente ricas en polifenoles sobre la actividad de las fosfatasa alcalinas hepáticas e intestinales en ratones jóvenes sanos o que hayan recibido la nitrosamina**

Parámetros	B	B+NDEA	C	C+NDEA	D	D+NDEA	E	E+NDEA
Actividad de la fosfatasa alcalina hepática	↓***	↑***	NS	↓***	↓***	NS	NS	↓*
Actividad de la fosfatasa alcalina intestinal	↓***	↓**	NS	↓*	↓***	↓***	NS	↓*

5 **Efecto de una suplementación durante 12 semanas con 20% de fracciones de cereales naturalmente ricas en polifenoles sobre la actividad de las fosfatasa alcalinas hepáticas e intestinales en ratones jóvenes sanos o que hayan recibido la nitrosamina**

Parámetros	B	B+NDEA	C	C+NDEA	D	D+NDEA	E	E+NDEA
Actividad de la fosfatasa alcalina hepática	↓***	↑*	↓***	↓**	NS	NS	NS	↑**
Actividad de la fosfatasa alcalina intestinal	NS	↑*	NS	NS	↓***	↑***	↓**	NS

10 **B. Efecto de la suplementación con las cuatro fracciones de cereales probadas (B, C, D y E) sobre el estado de Glutación en ratones jóvenes**

En los ratones sanos, la suplementación con las fracciones B, C y D implica la disminución significativa del cociente GSSG/GSH hepático. La fracción E no tiene aquí efecto significativo.

La suplementación con las fracciones C y D disminuye significativamente el cociente glutación oxidado (GSSG) /glutación reducido (GSH) intestinal, mientras que las fracciones B y E no tienen efecto.

15 En los ratones que hayan recibido la nitrosamina, el cociente GSSG/GSH es aumentado y por lo tanto aumentan los niveles de estrés oxidativo. La suplementación con las fracciones B, C y D implica la disminución significativa del cociente GSSG/GSH hepático.

20 **Efecto de una suplementación durante 6 semanas con 20% de fracciones de cereales naturalmente ricas en polifenoles sobre el cociente GSSG/GSH hepático e intestinal en ratones jóvenes sanos o que hayan recibido la nitrosamina**

Parámetros	B	B+NDEA	C	C+NDEA	D	D+NDEA	E	E+NDEA
Cociente GSSG/GSH hepático	↓***	↓*	↓***	↓***	↓***	↑***	NS	NS
Cociente GSSG/GSH intestinal	↑*	NS	↓***	↑**	↓***	NS	NS	↑***

**C. Efecto de la suplementación con cuatro fracciones de cereales (B, C, D y E) sobre las criptas aberrantes en jóvenes ratones que hayan recibido la nitrosamina**

25 Las criptas aberrantes (ACF) se reconocen como si fueron lesiones preneoplásicas iniciales. Por otra parte, el desarrollo de estas lesiones en el colon está vinculado a sucesos genotóxicos y se reconoce de aquí en adelante que los ACF puedan ser precursores del cáncer colorrectal (Bird, RP., McLellan, EA. and Bruce, WR. Aberrant crypts, putative precancerous lesions in the study of the role of diet in the aetiology of colon cancer. Cancer Surv. 1989; 8: 189-200. Pretlow, TP., O' Riordan, M., Somich, GA., Amini, SB. and Pretlow, TG. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. Carcinogenesis. 1992; 13: 1509-1512.

30 Apanasovich, TV., Sheather, S., Lupton, JR., Popovic, N., Turner, ND., Chapkin, RS., Braby, LA. and Carroll, R.J. Testing fuero spatial correlation en nonstationary binary data with aplicacion to aberrant crypt foci in colon carcinogenesis. Biometrics. 2003; 59: 752-761).

La suplementación de la dieta con fracciones de cereales naturalmente ricas en polifenoles disminuye la aparición de las criptas aberrantes en los ratones a 12 semanas.

**Conclusiones del estudio**

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que la suplementación con fracciones de cereales naturalmente ricas en polifenoles en ratones sanos tiene efectos beneficiosos sobre:

- 5 ➤ La actividad de las fosfatasas alcalinas en el hígado y en el intestino. Estos ratones tienen entonces un mejor estado de salud general que su control.
- El cociente GSSG/GSH, lo que traduce entonces una disminución del estrés oxidativo en estos ratones.

En los ratones que hayan recibido la nitrosamina al mismo tiempo que su suplementación, los resultados ponen de manifiesto que:

- 10 ➤ La suplementación permite disminuir la actividad de la fosfatasa alcalina hepática o intestinal a 6 semanas. Por lo tanto los sujetos suplementados tienen un mejor estado de salud que su correspondiente control.
- La suplementación tiene un efecto beneficioso sobre el estrés oxidativo a nivel hepático.
- Las fracciones de cereales protegen a los ratones contra la formación de criptas aberrantes.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto, por lo tanto, que la suplementación con las fracciones de cereales B, C, D y E tiene un efecto beneficioso sobre los parámetros estudiados de carcinogénesis y de oxidación.

15 **Así, la ingestión de productos de cereales según la invención que incorpora fracciones citadas más arriba, permite mejorar de manera significativa la salud de la población.**

**Efecto de una suplementación durante 6 semanas con 20% de fracciones de cereales naturalmente ricas en polifenoles sobre la actividad de las fosfatasas alcalinas en ratones jóvenes (con o sin NDEA) (valor relativo)**

Parámetros	Grupos	6 semanas	Grupos	6 semanas
Actividad de la fosfatasa alcalina hepática	Control	100,51	Control + NDEA	100
	B	68,94	B + NDEA	119,46
	C	100,56	C + NDEA	83,44
	D	79,38	D + NDEA	101,52
	E	102,2	E + NDEA	94,31
Actividad de la fosfatasa alcalina intestinal	Control	100	Control + NDEA	100
	B	54,8	B + NDEA	61,48
	C	112,83	C + NDEA	75,8
	D	51,47	D + NDEA	37,47
	E	99,76	E + NDEA	74,91

20 **Efecto de una suplementación durante 6 y 12 semanas con 20% de fracciones de cereales naturalmente ricas en polifenoles sobre el estatuto de glutatión hepático e intestinal en ratones jóvenes (con o sin NDEA) (valor relativo)**

Parámetros	Grupos	6 semanas	12 semanas	Grupos	6 semanas	12 semanas
Cociente GSSG/GSH hepático	Control	100	100	Control + NDEA	100	100
	B	80,37	84,55	B + NDEA	92,33	90,88
	C	75,5	72,22	C + NDEA	81,11	94,22
	D	55,25	49,22	D + NDEA	56	64,55
	E	97,55	94,44	E + NDEA	96,77	101,5

<b>Parámetros</b>	<b>Grupos</b>	<b>6 semanas</b>	<b>12 semanas</b>	<b>Grupos</b>	<b>6 semanas</b>	<b>12 semanas</b>
Cociente GSSG/GSH intestinal	Control	100,44	100	Control +NDEA	100	100
	B	116,77	94,66	B + NDEA	87,57	85,5
	C	71,16	78,55	C + NDEA	136,79	110,44
	D	53,45	58,44	D + NDEA	113,5	98,37
	E	104,17	96,77	E + NDEA	162	147,88

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Producto de cereales de bizcochería o de panificación seca que contiene harina de trigo, caracterizado por que 20-40% en peso de harina de trigo es sustituido por una fracción de cereal o pseudocereal constituido por:
- 15-25% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz, o
- 5
- 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de harina de alforfón, o
  - 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de moyuelos blancos de trigo, o
  - 5-15% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz + 5-15% de gérmenes de trigo,
- representando dicha fracción de cereal o pseudocereal 10-25% en peso con respecto al peso total de los ingredientes,
- 10
- poseyendo dicho producto de cereales alto poder antioxidante tal como se mide por el método ORAC (acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity) superior o igual a 17  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por gramo de producto terminado ( $\mu\text{mol TE/g}$ ), siendo dicho poder oxidando esencialmente aportado por la presencia como ingrediente de dicha fracción de cereal o pseudocereal.
- 15
- 2.- Producto de cereales según la reivindicación 1, que contiene al menos 4, preferentemente al menos 5 equivalentes-miligramos de ácido gálico de polifenoles totales por gramo de producto terminado (Eq. mg de ácido Gálico/g).
- 20
- 3.- Producto de cereales según una u otra de las reivindicaciones 1 y 2, que contiene al menos un polifenol elegido entre los flavonoides, en particular, la quercetina y la rutina, y los ácidos fenólicos, en particular, los ácidos hidroxibenzoicos, los ácidos hidroxicinámicos, el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido vanílico, el ácido p-cumárico, el ácido sinápico, el ácido ferúlico y sus derivados esterificados tal como el  $\gamma$ -orizanol, así como sus mezclas, siendo preferido el ácido ferúlico.
- 25
- 4.- Producto de cereales según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene:
- al menos 50, preferentemente al menos 100 mg de magnesio por 100 g de producto terminado y/o
  - al menos 0,8, preferentemente al menos 1,3 mg de cinc por 100 g de producto terminado y/o
- 30
- al menos 1, preferentemente al menos 2  $\mu\text{g}$  de selenio por 100 g de producto terminado.
- 5.- Producto de cereales según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contienen:
- al menos 0,20, preferentemente al menos 0,30 mg de vitamina B1 por 100 g de producto terminado y/o
  - al menos 40, preferentemente al menos 50  $\mu\text{g}$  de vitamina B9 por 100 g de producto terminado.
- 35
- 6.- Producto de cereales según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que 30% en peso de harina de trigo son sustituidos por al menos una fracción de cereal o pseudocereal.
- 40
- 7.- Producto de cereales según la reivindicación anterior, en el cual 30% en peso de harina de trigo son sustituidos por:
- 20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz, o
  - 20% de salvado de arroz + 10% de harina de alforfón, o
- 35
- preferentemente 20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo, o
  - 10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% de gérmenes de trigo.
- 8.- Producto de cereales según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contienen por otro lado al menos un ingrediente o aditivo elegido entre los azúcares, los edulcorantes, los frutos secos, los emulgentes, los potenciadores de sabor, los aromas, los gasificantes, los colorantes, las materias grasas tales como los aceites alimentarios, los huevos y productos derivados, los productos lácteos y la sal de mesa.
- 40
- 9.- Producto de cereales según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene, por otro lado, al menos una fruta, en particular, bayas, y/o al menos un fruto seco, chocolate, y/o extracto de té verde.
- 10.- Procedimiento de fabricación de un producto de cereales según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que incluye las siguientes etapas:

- a. selección de los ingredientes,
- b. mezcla de dichos ingredientes, en una o varias operaciones, en particular, en una artesa,
- c. elaboración de dicho producto, en particular, por moldeado en la rotativa, recorte en el rotocortador y después del laminado, aglomeración, extrusión, coextrusión, colado de la pasta sobre bandas sólidas o en moldes de cocción,
- d. facultativamente cocción y/o enfriamiento, y
- e. facultativamente embalaje,

5

en el cual dichos ingredientes incluyen al menos una fracción de cereal y/o al menos una fracción de pseudocereal.

11.- Procedimiento según la reivindicación anterior, en el cual 30% en peso de la harina de trigo son sustituidos por:

10

- 20% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz, o
- 20% de salvado de arroz + 10% de harina de alforfón, o
- 20% de salvado de arroz + 10% de moyuelos blancos de trigo, o
- 10% de harina de alforfón + 10% de salvado de arroz + 10% de gérmenes de trigo.

15

12.- Producto de cereales según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, u obtenido por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11 para su utilización en el aumento, en particular, en un sujeto humano, de la aportación en antioxidantes naturales y/o en vitaminas B1, B9, y/o en minerales: cinc, magnesio y selenio y/o en fibras así como en la prevención de los efectos nocivos vinculados al estrés oxidativo y de la disminución de la función inmunitaria.

13.- Utilización de una fracción de cereal o de pseudocereal constituido por:

20

- 15-25% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz, o
- 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de harina de alforfón, o
- 15-25% de salvado de arroz + 5-15% de moyuelos blancos de trigo, o
- 5-15% de harina de alforfón + 5-15% de salvado de arroz + 5-15% de gérmenes de trigo,

25

para sustituir 20-40% en peso de harina de trigo en un producto de cereales de bizcochería o de panificación seca que contienen la harina de trigo,

representando dicha fracción de cereal o de pseudocereal 10-25% en peso con respecto al peso total de los ingredientes,

30

poseyendo dicho producto de cereales un alto poder antioxidante tal como se mide por el método ORAC (acrónimo de la expresión inglesa Oxygen Radical Absorbance Capacity) superior o igual a 17  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por gramo de producto terminado ( $\mu\text{mol TE/g}$ ), siendo dicho poder oxidante aportado esencialmente por la presencia como ingrediente de dicha fracción de cereal o pseudocereal.

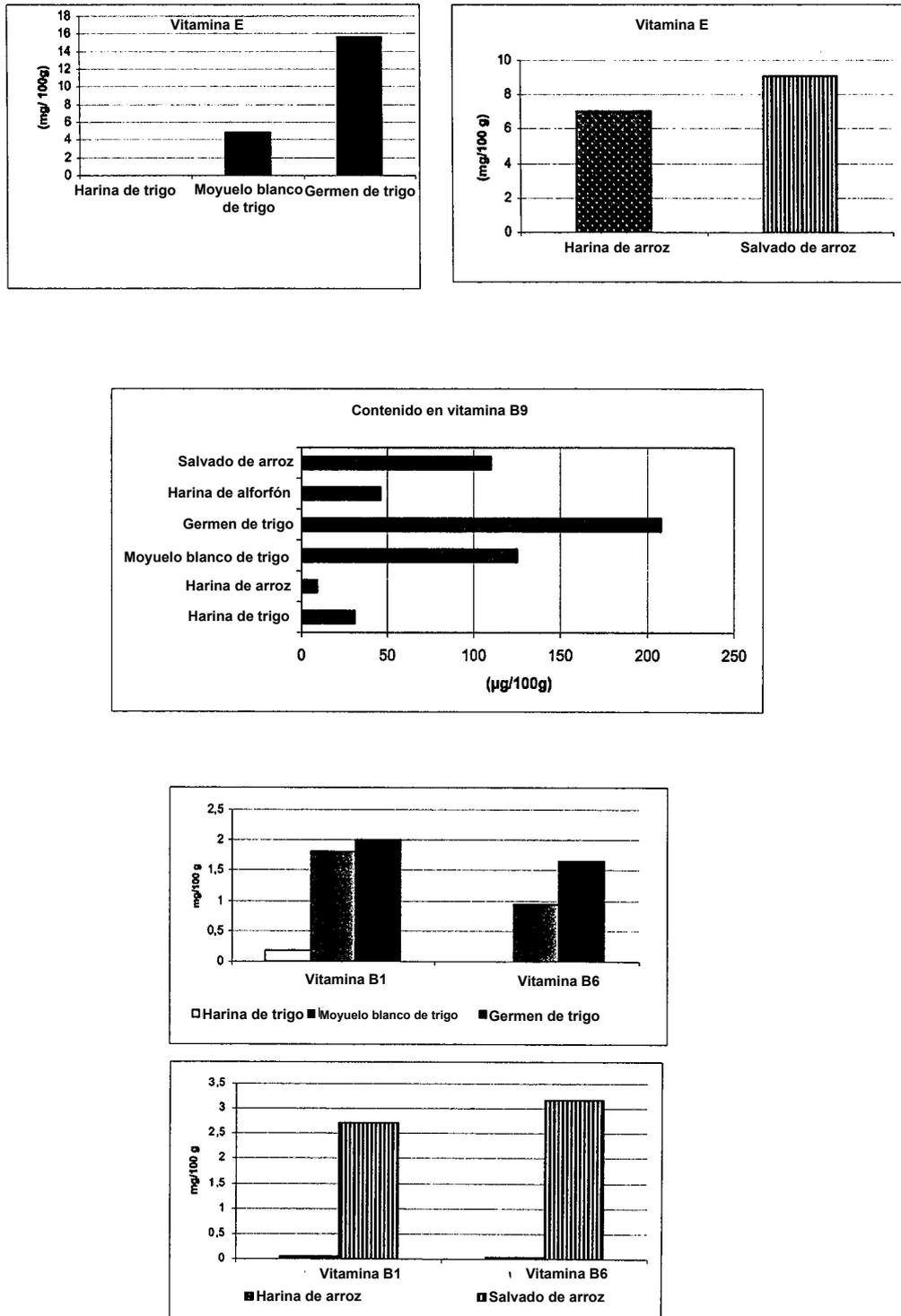


Fig. 1. Contenido en vitaminas de las fracciones de cereales y pseudocereales según la invención.

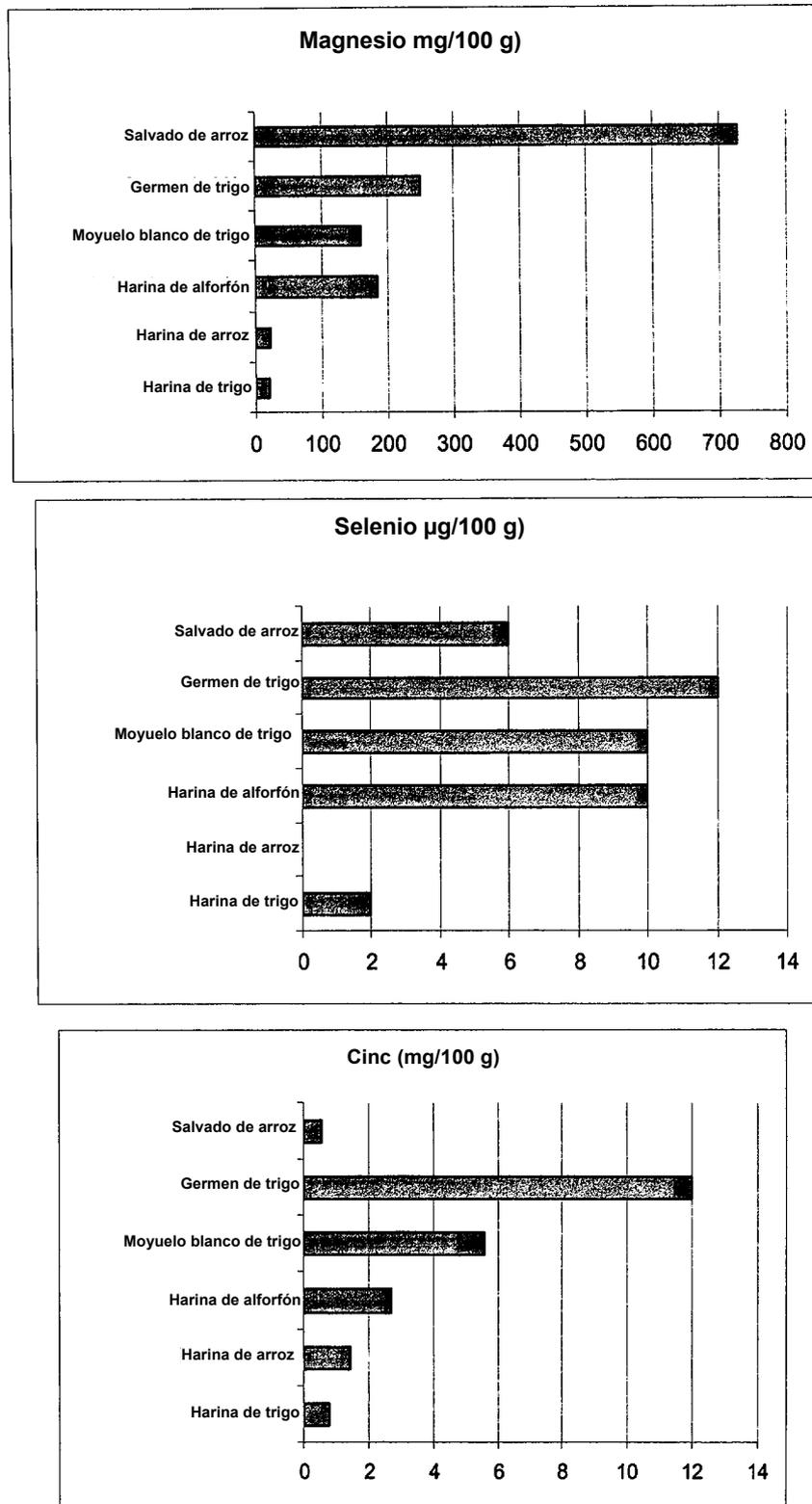


Fig. 2. Contenido en Mg, Se y Zn de las fracciones de cereales y pseudocereales según la invención.

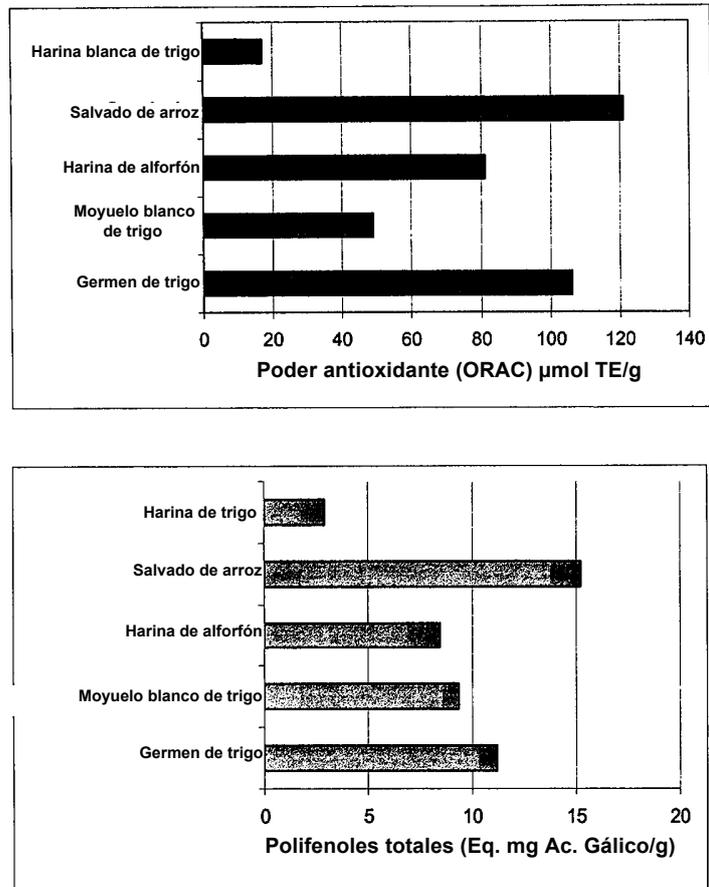


Fig. 3. Poder antioxidante y contenido en polifenoles totales de las fracciones de cereales y pseudocereales según la invención.

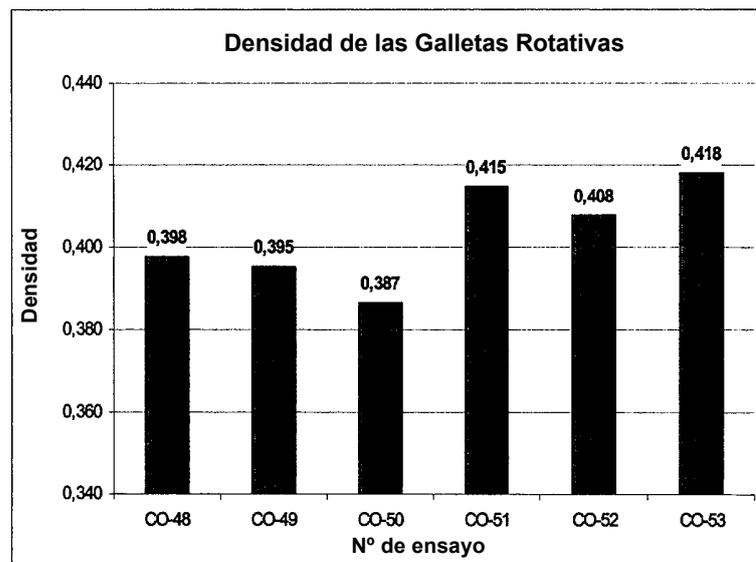
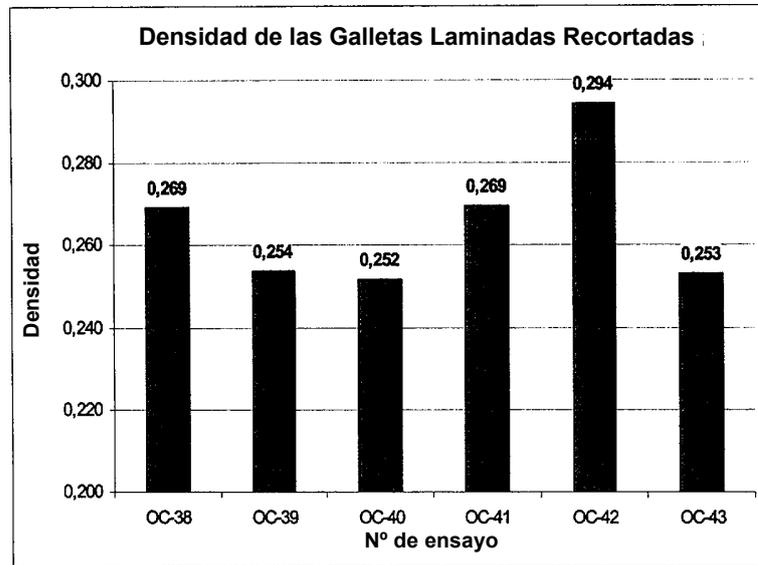


Fig. 4. Densidad de las galletas según la invención

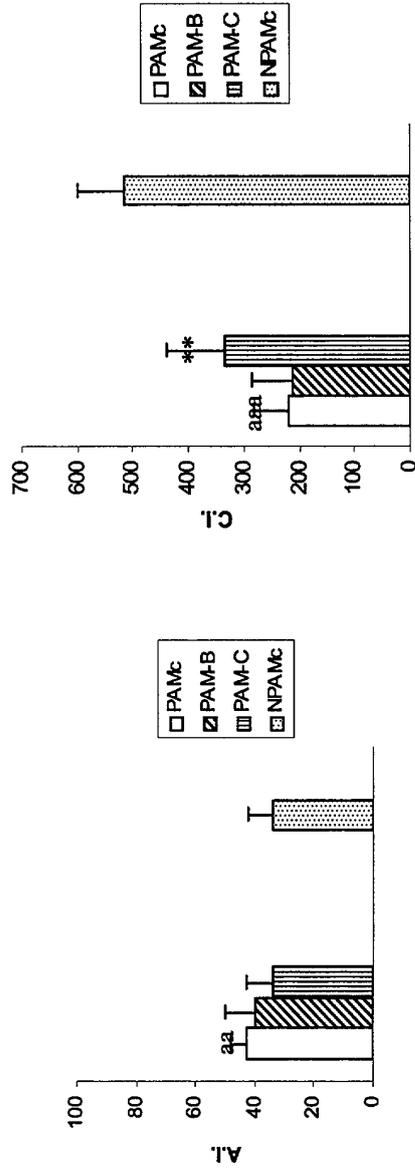


Fig. 5. Índice de adherencia (A.I.) y de quimiotaxia (C.I.) de macrófagos peritoneales de hembras de ratones suizos.

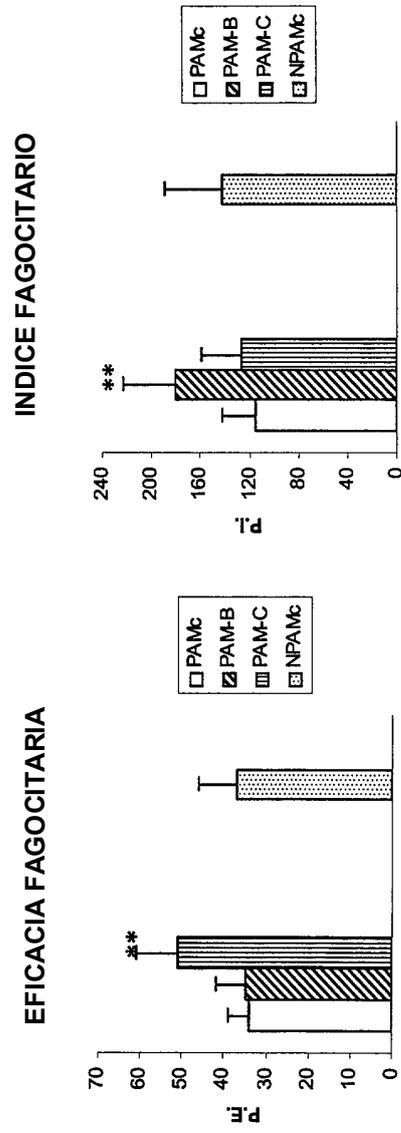


Fig. 6. Eficacia fagocitaria P.E. (número de macrófagos fagocitantes/100 macrófagos, P.E.) e índice fagocitario P.I. (número de partículas de látex ingeridas por 100 macrófagos, P.I.) de macrófagos peritoneales de hembras de ratones suizos.

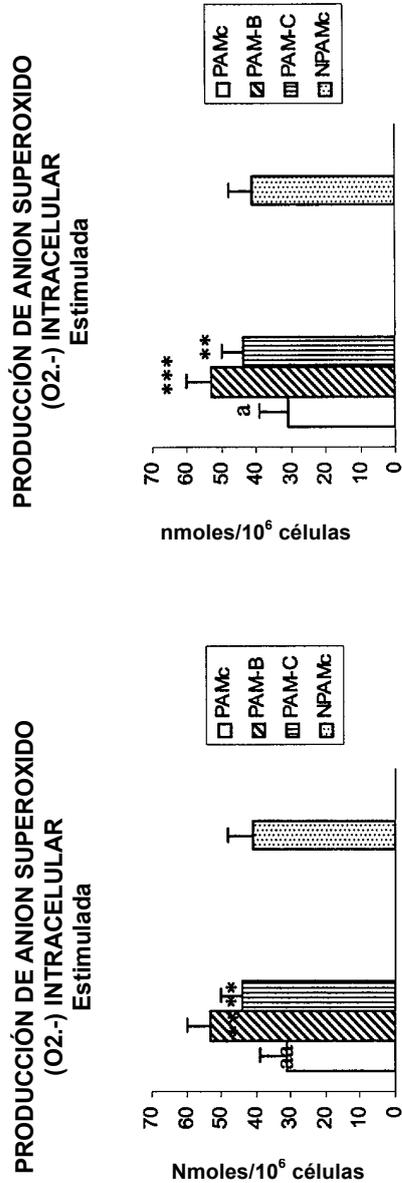


Fig. 7. Producción no estimulada y estimulada (bolas de látex) de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) intracelular por macrófagos peritoneales de hembras de ratones suizos.

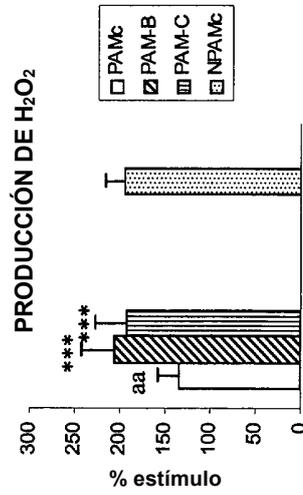
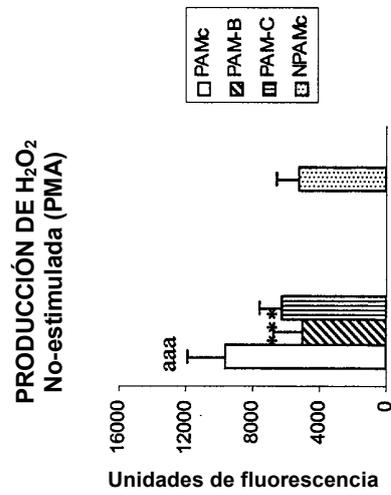
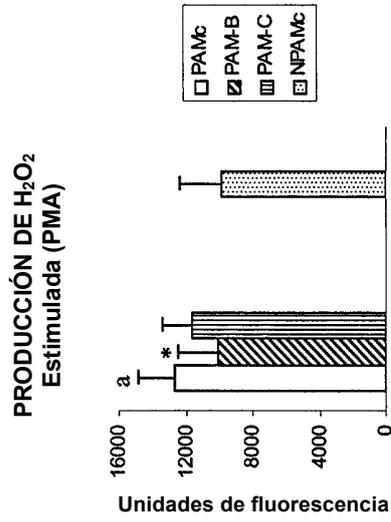
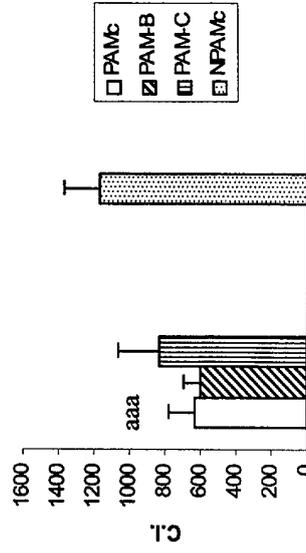


Fig. 8. Producción de ROS no estimulada y estimulada (PMA) y porcentaje (%) de estímulo en respuesta a PMA por macrófagos peritoneales de hembras de ratones suizos.

QUIMIOTAXIA DE LOS LINFOCITOS



ADHERENCIA DE LOS LINFOCITOS

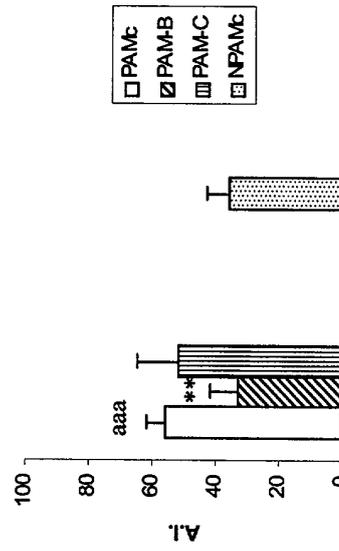


Fig. 9. Índice de adherencia (A.I.) e índice de quimiotaxia de linfocitos peritoneales de hembras de ratones suizos.

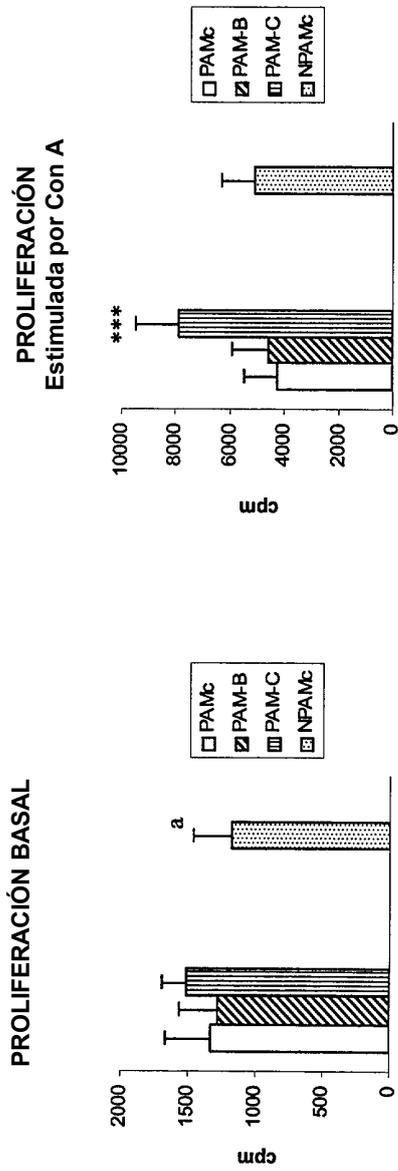
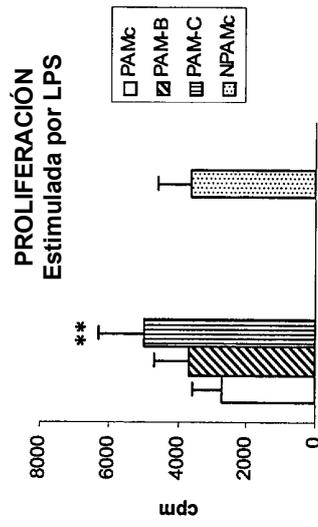


Fig. 10. Proliferación basal, proliferación estimulada por Con A, y proliferación estimulada por LPS por linfocitos peritoneales de hembras de ratones suizos.



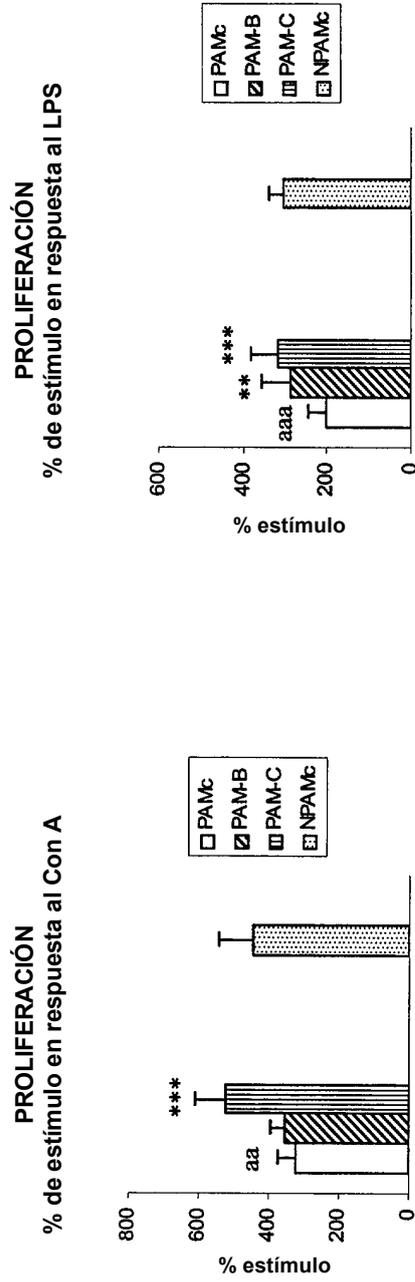


Fig. 11. Porcentaje (%) de estímulo en respuesta a Con A y porcentaje de estímulo en respuesta a LPS por linfocitos peritoneales de hembras de ratones suizos.

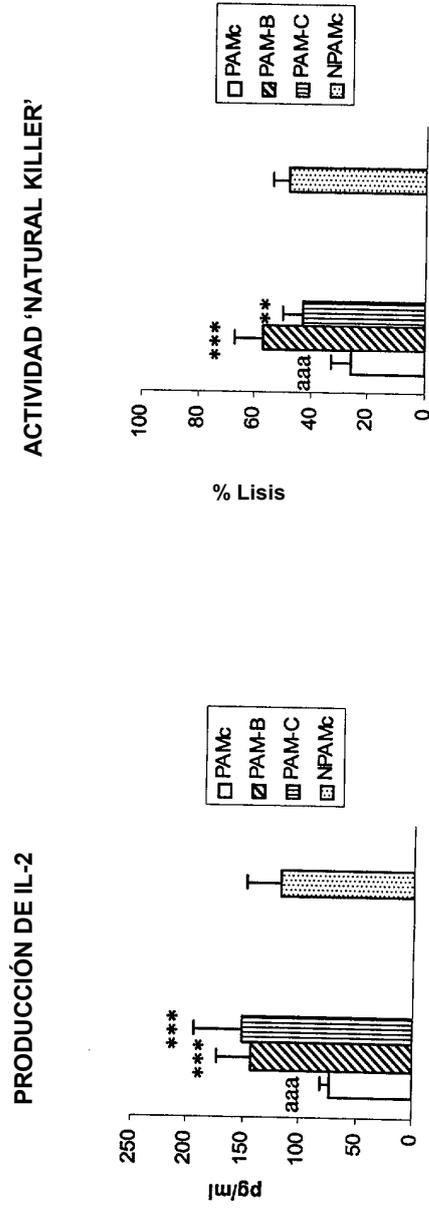


Fig. 12. Producción de IL-2 y actividad "natural killer" por linfocitos peritoneales de hembras de ratones suizos.