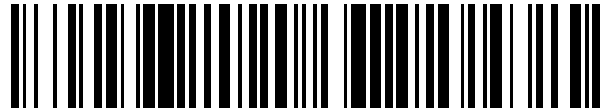


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 655**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/16** (2006.01)  
**A23L 2/52** (2006.01)  
**A61K 33/00** (2006.01)  
**A61K 36/185** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2008 PCT/SE2008/050211**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2008 WO08105730**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2008 E 08712839 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2124638**

54 Título: **Composición que mejora el rendimiento y uso de la misma**

30 Prioridad:

**26.02.2007 SE 0700520**  
**22.03.2007 SE 0700729**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.06.2017**

73 Titular/es:

**HEARTBEET LTD. (100.0%)**  
**c/o James White Drinks Ltd. White's fruit farm**  
**Ashbocking**  
**Ipswich IP6 9JS , GB**

72 Inventor/es:

**LUNDBERG, JON y**  
**WEITZBERG, EDDIE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 618 655 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

Composición que mejora el rendimiento y uso de la misma

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los alimentos nutricionales y suplementos alimentarios, líquidos y productos comestibles sólidos que aumentan el rendimiento, tales como bebidas deportivas, bebidas energéticas y barras energéticas.

10

## Antecedentes

Actualmente se cree que se puede lograr una mejora en el rendimiento deportivo mediante la ingesta de las denominadas bebidas deportivas. Por lo general no tienen gas y con frecuencia contienen fructosa u otros azúcares y carbohidratos complejos, que son fácilmente absorbidos por el cuerpo, y están diseñados para promover la disponibilidad de energía y/o prevenir o tratar la deshidratación leve. Las bebidas deportivas también contienen electrolitos (principalmente sales de sodio y potasio) y nutrientes (proteínas y aminoácidos). Las bebidas deportivas, bebidas energéticas y otros productos líquidos, semisólidos y sólidos, aunque se comercializan para los atletas, también son consumidos por no atletas, como aperitivo, en situaciones donde se desea más energía y resistencia.

20

A veces se hace una distinción entre bebidas deportivas y bebidas energéticas, las primeras que suelen ser más isotónicas, y las segundas que contienen más azúcar y con frecuencia también cafeína. En este contexto, no se pretende esta distinción, y el término "alimento o suplemento alimentario que mejora el rendimiento" incluye bebidas deportivas y bebidas energéticas, así como cualquier otro líquido, formas semisólidas o sólidas, tales como tabletas, barritas energéticas, etc. como se describe en más detalle a continuación.

25

Sin embargo la adaptación fisiológica al ejercicio implica grandes cambios cardiovasculares y metabólicos. El consumo de oxígeno aumenta drásticamente en los músculos activos con un aumento paralelo en el flujo sanguíneo muscular. En estos procesos el óxido nítrico gaseoso endógeno (NO) desempeña un papel regulador importante. El NO aumenta el flujo sanguíneo a los músculos y modula la contracción muscular y la absorción de glucosa (para una revisión véase Stamler, JS, et al. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev.* 2001, vol. 81, n.º 1, p. 209-37).

30

Además, el NO está implicado en el control de la respiración celular mediante la interacción con enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial (para una revisión véase MONCADA, S, et al. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, vol. 3, n.º 3, p. 214-20).

35

Los estudios *in vitro* publicados en la década de 1990 muestran que el NO es un modulador de la respiración mitocondrial mediante la inhibición reversible de la oxidasa del citocromo c (CARR, GJ, et al. Nitric oxide formed by nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* is sufficiently stable to inhibit cytochrome oxidase activity and is reduced by its reductase under aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta.* 15 de mayo de 1990, vol. 1017, n.º 1, p. 57-62; BOLANOS, J P, et al. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 1994, vol. 63, n.º 2, p. 910-6; BROWN, G C, et al. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 19 de Dic de 1994, vol. 356, n.º 2-3, p. 295-8; CLEETER, M W, et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 23 de mayo de 1994, vol. 345, n.º 1, p. 50-4; and SCHWEIZER, M, et al. Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Comm.* 1994, n.º 204, p. 169-75).

40

45

El NO también puede interactuar en otros sitios de la cadena respiratoria mitocondrial y en el ciclo de Krebs (para una revisión vease Moncada, *supra*). Aunque esta acción importante del NO se ha caracterizado muy bien en cultivos celulares, se sabe menos acerca de su relevancia fisiológica *in vivo* y los efectos del NO sobre la respiración celular durante el ejercicio físico. Shen y sus colaboradores demostraron que la administración de inhibidores *in vivo* de la NOS durante ejercicio submáximo da lugar a un aumento del consumo de oxígeno en perros (SHEN, W, et al., Role of NO in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circulation Res.* 1999, n.º 84, p. 840-5) y Lacerda y sus colaboradores demostraron resultados similares en ratas (LACERDA, A C R, et al. Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing). La mayoría de los estudios se han realizado utilizando inhibidores de la NOS, mientras que los efectos de la administración de NO exógeno sobre el ejercicio son en gran parte desconocidos. Además, los estudios en seres humanos sanos son escasos.

55

60

El medio clásico por el que se produce la producción de NO es la vía de la L-arginina, donde el NO es sintetizado por enzimas específicas, las NO-sintasas. Una manera alternativa fundamentalmente diferente de generar NO ha sido descrita más recientemente (LUNDBERG, J O, et al. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut.* 1994, vol. 35, n.º 11, p. 1543-6; BENJAMIN, N, et al. Stomach NO synthesis. *Nature.* 7 de abril de 1994, vol. 368, n.º 6471, p. 502; ZWEIER, J L, et al. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med.* 1995, vol. 1, n.º 8, p. 804-9; y WEITZBERG, E, et al. Non-enzymatic nitric oxide

65

production in humans. *NO Biol Chem.* 1998, n.º 2, p. 1-7). En esta vía independiente de la NOS, los aniones inorgánicos de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) se reducen *in vivo* para formar NO. El nitrato dietético (que se encuentra principalmente en verduras de hoja verde) (MCKNIGHT, G M. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut.* 1997, n.º 40, p. 211-214; y Weitzberg, 1998, supra) se absorbe en la circulación por las glándulas salivales, se secreta en la saliva y se convierte en parte a nitrito en la cavidad oral por bacterias reductoras de nitrato. El nitrito ingerido puede entrar en la circulación sistémica. De hecho, un estudio reciente muestra que la ingestión de nitrato da lugar a un aumento sostenido de los niveles de nitritos circulantes (LUNDBERG, J O, et al. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Rad Bio Med.* 2004, vol. 37, n.º 3, p. 395-400). La reducción adicional del nitrito en NO bioactivo puede producirse espontáneamente en ambientes ácidos o reductores (Benjamin et al. 1994, supra, Lundberg et al. 1994, supra) pero también mejora en gran medida por diversas proteínas y enzimas que incluyen la desoxihemoglobina en la sangre (COSBY, K, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003, vol. 9, n.º 12, p. 1498-505), la desoximioglobina (SHIVA, S, et al. Deoxymyoglobin is a Nitrite Reductase That Generates Nitric Oxide and Regulates Mitochondrial Respiration. *Circ Res.* 9 de Feb de 2007), la xantina oxidasa (MILLAR, T M, et al. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 8 de mayo de 1998, vol. 427, n.º 2, p. 225-8) y posiblemente por enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial (para una revisión véase LUNDBERG, J O, et al. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol.* 2004, vol. 2, n.º 7, p. 593-602; LUNDBERG, J O, et al. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005, vol. 25, n.º 5, p. 915-22; y GLADWIN, M T, et al. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol.* 2005, vol. 1, n.º 6, p. 308-14). La producción de NO independiente de NOS parece complementar la producción endógena de NO, especialmente durante la isquemia y la acidosis cuando la disponibilidad de oxígeno es baja y las NO sintasas funcionan mal (Zweier et al. 1995, supra; Weitzberg et al., 1998, supra; DURANSKI, M R, et al. Cytoprotective effects of nitrite during *in vivo* ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest* 2005, vol. 115, n.º 5, p. 1232-40; Lundberg et al., 2004, supra). La acidosis tisular y la hipoxia relativa también están presentes durante el ejercicio físico y en este estado metabólico, es probable que se mejore la bioactivación de nitrito.

La información disponible sobre el papel del NO en sujetos sanos y en particular en atletas durante el trabajo o el ejercicio es a la vez insuficiente y contradictoria. Curiosamente, la publicidad de algunos suplementos alimentarios disponibles en la actualidad para atletas y culturistas se refiere al efecto vasodilatador del NO. Un ejemplo es "NOX2" (Bodyonics, Ltd., EE. UU.), un producto que dice que contiene alfa-cetoglutarato de arginina (A-AKG) y cetoisocaproato de arginina (A-KIC) y, al parecer es capaz de aumentar los niveles de óxido nítrico a corto plazo. Otros productos contienen L-arginina, a partir de la cual se sintetiza el NO por las enzimas NOS, y a menudo se hace referencia a los efectos beneficiosos del NO sin ofrecer no obstante explicaciones más detalladas.

Se ha estudiado la relación entre la tasa máxima de trabajo y los niveles de reposo del nitrato en plasma y orina de sujetos con diferentes niveles de aptitud física (Jungersten et al., Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol* 82:760-764, 1997). Se encontró una relación positiva entre la condición física y la formación de NO en reposo y se planteó la hipótesis de que esta relación positiva ayuda a explicar los efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre la salud cardiovascular. En el estudio de Jungersten el nitrato se utiliza únicamente como marcador de la producción de NO y los autores afirman varias veces que el nitrato es un producto final estable e inerte del NO y que es biológicamente inactivo.

Los presentes inventores se propusieron analizar si la administración de nitrato en la dieta daría lugar a un aumento de las reservas de almacenamiento sistémico de nitrito y si esta estrategia dietética tendría un impacto en diversos parámetros fisiológicos y bioquímicos durante el ejercicio.

Crawford et al. (Effect of nitrate on determinants of myocardial oxygen consumption during exercise, *International Journal of Cardiology*, Vol. 1, n.º 3-4, 1 de enero de 1982, pág. 307-314) investigó la demanda de oxígeno del miocardio después de la administración de dinitrato de isosorbida, un nitrato orgánico.

El documento WO 2006/110601 tiene como objetivo, entre otras cosas, la reducción de la mortalidad asociada a la insuficiencia cardíaca; y ha investigado los efectos del dinitrato de isosorbida y/o del mononitrato de isosorbida. Al igual que el artículo anterior de Crawford et al., esta referencia también se centra en el corazón, y aunque usa términos como "mejorar la tolerancia al ejercicio" y "mejorar el consumo de oxígeno", está claro que se desea aumentar el consumo de oxígeno. El documento WO 2006/110601 define la mejora del consumo de oxígeno de la siguiente manera: "Un aumento en el consumo de oxígeno de un paciente normalmente resulta en una mayor tolerancia al ejercicio del paciente e implicaría que el paciente tendría una mejor calidad de vida".

El documento KR 2002 0057695 se refiere a la producción de alimentos naturales a base de multivitaminas que utilizan los vegetales.

Cohn et al. (A comparison of enalapril with hydralazine isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure, *New England Journal of Medicine*, Vol. 325, n.º 5, 1 de enero de 1991, pág. 303-310) se refiere a una comparación entre enalapril y dinitrato de isosorbida en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva crónica, como es evidente a partir del título. Al usar estos nitratos orgánicos, Cohn et al. observa un efecto

vasodilatador y el aumento de consumo de oxígeno.

El documento de Estados Unidos 2004/204371 y EE. UU. 4.868.179 desvela una comparación entre el enalapril y el dinitrato de isosorbida, un nitrato orgánico, y enseña "que mejora el consumo de oxígeno", que se manifiesta como un aumento del consumo de oxígeno. Estos documentos también se ocupan del dinitrato de isosorbida, un nitrato orgánico. También es destacable que en el documento de Estados Unidos 2004/204371 y Estados Unidos 4.868.179 el dinitrato de isosorbida se combina con hidralazina y no se analiza por sí solo lo que hace que la comparación con el nitrato inorgánico sea aún menos relevante.

Peri et al. estudian los efectos de los extractos de manzana en la liberación de NO por la saliva humana a pH 2 (Peri et al., Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: A new biological function for polyphenols with a catechol group?, Free Radical Biology and Medicine, Vol. 39, n.º 5, 1 de septiembre de 2005, páginas 668-681.

Deng et al. investiga si el nitrito de etilo se podía detectar in vitro a partir de la reacción de etanol con peroxinitrito, así como después de la administración de etanol a ratones. (Deng et al., Formation of ethyl nitrite in vivo after ethanol administration, Alcohol, Vol. 34, n.º 2-3, 1 de octubre de 2004, páginas 217-223).

En dos artículos científicos, Shibata et al. investiga el consumo de oxígeno por las paredes de las arteriolas en el músculo esquelético de rata (M Shibata et al., Vascular wall energetics in arterioles during nitric oxide-dependent and-independent vasodilation, Journal of Applied Physiology, 100:1793-1798, 2006) y M. Shibata et al., Nitric oxide modulates oxygen consumption by arteriolar walls in rat skeletal muscle, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 289, H2673-H2679, 2005).

Sumario de la invención

Los inventores sorprendentemente descubrieron que el rendimiento de un mamífero que se manifiesta como consumo reducido de oxígeno ( $VO_2$ ) durante el ejercicio se mejoró mediante la administración a dicho mamífero de una cantidad no tóxica de nitrato y/o nitrito. En base a este hallazgo, los inventores ponen a disposición un método para mejorar no terapéuticamente el rendimiento de un mamífero, así como el uso de nitrato o nitrito inorgánico o una combinación de los mismos como se define en las reivindicaciones adjuntas. La siguiente descripción está sujeta a esta limitación.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá con más detalle en la siguiente descripción, ejemplos y reivindicaciones no limitantes, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 muestra un gráfico que ilustra numerosas formas en las que la combinación de nitrato y polifenoles actúa sinérgicamente para aumentar la biodisponibilidad del óxido nítrico y, al mismo tiempo reduce la formación de compuestos nocivos tales como los radicales de oxígeno y nitrosaminas. Para una explicación más detallada véase el texto a continuación.

La Figura 2 ilustra los efectos de un suplemento dietético con nitrato de sodio o cloruro de sodio (placebo) a las concentraciones plasmáticas de nitrito medidas en reposo e inmediatamente después del ejercicio en 9 voluntarios varones sanos.

La Figura 3 muestra el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) y la frecuencia cardíaca (FC) medidos a 6 cargas de trabajo diferentes después de una suplementación de la dieta de 3 días con nitrato de sodio (0,1 mmol/kg/día, NIT) o una cantidad equivalente de cloruro sódico (CON). El estudio tenía un diseño aleatorizado, doble ciego cruzado con un período de lavado de al menos 10 días entre las pruebas. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

La Figura 4 muestra el consumo de oxígeno a un 80 % del  $VO_{2\text{pico}}$  en 9 voluntarios sanos de sexo masculino. Las mediciones se realizaron después de una suplementación de la dieta de 3 días con nitrato (0,1 mmol/kg/día) o una cantidad igual de cloruro de sodio (placebo). La diferencia entre los períodos de nitrato y de placebo fue significativa ( $p < 0,01$ ).

La Figura 5 muestra la concentración de lactato en plasma medida a 6 cargas de trabajo diferentes después de la suplementación dietética con nitrato de sodio (0,1 mmol/kg/día durante 3 días, barras rellenas) o una cantidad equivalente de cloruro sódico (placebo, barras vacías).

Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento se utiliza con el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Hay que señalar que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar una desviación de  $\pm 2\%$  del valor dado, preferentemente  $\pm 5\%$ , y lo más preferentemente  $\pm 10\%$  de los valores numéricos, donde corresponda.

5 El término "comestible" en este contexto significa no tóxico y que se puede ingerir, sin embargo no se limita a modos de ingestión particulares, tales como beber, mascar, la aplicación en la cavidad oral en diversas formas, tales como, por ejemplo, un pulverizador o un aerosol.

10 El término "alimento funcional" se refiere a cualquier alimento fresco o procesado que se dice que tiene una propiedad que promueve la salud y/o de prevención de enfermedades más allá de la función nutricional básica de suministro de nutrientes. Los alimentos funcionales a veces se denominan nutracéuticos. La categoría general incluye alimentos procesados a base de ingredientes de alimentos funcionales, o suplementados con aditivos promotores de la salud, como productos "enriquecidos con vitaminas", y también, por ejemplo, alimentos frescos (verduras) que tienen demandas específicas asociadas. Los alimentos fermentados con cultivos vivos a menudo también se consideran alimentos funcionales con beneficios probióticos.

15 Los presentes inventores demostraron que la suplementación dietética con nitrato inorgánico produce en un  $VO_2$  reducido durante el ejercicio físico y un aumento significativo en la eficiencia muscular. Estos efectos se produjeron sin ningún incremento en el lactato en plasma.

20 Muchas verduras y frutas son ricas en polifenoles. Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en las plantas, caracterizado por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles generalmente se subdividen en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, tales como ligninas, flavonoides y taninos condensados. Así, en una realización de la presente invención, la composición que comprende el nitrato y/o nitrito se mezcla con un compuesto que contiene altos niveles de polifenoles. La relación de la composición que comprende nitrato: compuesto rico en polifenoles se debe seleccionar para obtener un suministro de nitrato suficiente. Por consiguiente, la composición de nitrato y/o nitrito que comprende debe ser de al menos aproximadamente el 10 %, preferentemente de al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente de al menos aproximadamente el 30 %, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente el 40 % y lo más preferentemente de al menos aproximadamente el 50 % o incluso superior. Se contempla que este producto combinado tendrá un efecto promotor sinérgico de la salud al potenciar la biodisponibilidad del NO. Los polifenoles mejorarán la generación de NO por varios mecanismos independientes de relieve en la Figura 1. En primer lugar, estos agentes pueden estimular directamente la formación de NO endógeno a partir de las enzimas de NO sintasa (1 en la Figura 1). En segundo lugar, se contempla que estos compuestos mejoren la reducción de nitrito a NO bioactivo debido a la presencia de grupos -OH reductores en el anillo de fenol (2 en la Figura 1). En tercer lugar, al actuar como captadores de radicales libres como el superóxido, impiden que estos radicales interaccionen con (y destruyan) el NO y por lo tanto el NO perdura más tiempo (3 en la Figura 1). Además de esto, el nitrito o sus productos de reacción pueden interactuar con el propio polifenol y modificarlo químicamente a través de reacciones de nitración o nitrosación (4a en la Figura 1). El compuesto resultante puede actuar como un donador longevo de NO (4b en la Figura 1). Un efecto adicional es que la presencia de polifenoles alejará las reacciones químicas de formación de nitrosaminas potencialmente cancerígenas (5 en la Figura 1). Los productos de reacción de nitratos, el nitrito, puede reaccionar con aminas para formar nitrosaminas, pero los polifenoles inhibirán esta reacción por un mecanismo dual. En primer lugar ayudan a reducir rápidamente el  $HNO_2$  directamente a NO minimizando así la formación de especies nitrosantes ( $N_2O_3$ ,  $HNO_2$ ). En segundo lugar, pueden competir directamente por nitrosación con las aminas al nitrosarse ellos mismos.

45 Los presentes inventores consideran la presentación de la composición al mercado en forma de bebida deportiva, bebida energética, barrita deportiva, o barrita energética.

50 La barrita energética puede adoptar diversas formas. Por conveniencia, se prefiere que el producto alimentario energético adopte la forma de una caja, cuadrado, cilindro, cadena, pastel, esfera, triángulo, o cualquier otro formato adecuado para el envasado, transporte, manipulación e ingesta.

De acuerdo con otra realización, la composición se presenta al mercado como producto alimentario funcional.

55 Los productos que comprenden el nitrato inorgánico, nitrito o una combinación de los mismos se pueden fabricar fácilmente por los expertos en la industria de alimentación, dulces y bebidas o la industria farmacéutica, y las composiciones existentes suplementadas con nitrato, nitrito y otras combinaciones descritas en este documento en cantidades de acuerdo con esta invención.

60 Por ejemplo una barrita energética de acuerdo con la presente invención puede incluir, además de nitrato y opcionalmente nitrito, también una variedad de otros componentes, tales como, por ejemplo, frutos secos, productos crujientes, trozos de fruta, chocolate, semillas, y similares. Los frutos secos preferidos son las almendras, cacahuètes, avellanas, anacardos, nueces, pecanas, nueces de Brasil, y similares. Los productos crujientes incluyen arroz crujiente, maíz crujiente, avena, copos de trigo, y similares. El chocolate puede ser cualquier tipo de chocolate o componente comestible similar al chocolate en diversas formas, tales como, por ejemplo, virutas, trozos, escamas de chocolate y similares. Los ejemplos no limitantes de las semillas incluyen semillas de sésamo, girasol, amapola,

alcaravea, hinojo y similares.

Además, se pueden incluir ingredientes alimentarios tradicionales tales como aromas y similares. Por ejemplo, los ingredientes adicionales pueden incluir sabores naturales y artificiales, edulcorantes, sal, potenciadores del sabor, colorantes, emulsionantes, estabilizantes, conservantes, grasas, y similares.

La presente invención también pone a disposición un segundo uso no médico del nitrato y/o nitrito inorgánico, es decir, para la fabricación de una composición para mejorar el rendimiento de un mamífero en el que el efecto de mejora del rendimiento se manifiesta como una reducción de  $VO_2$  durante el ejercicio físico.

Preferentemente, el efecto de mejora del rendimiento se manifiesta tanto como por una reducción del  $VO_2$  durante el ejercicio físico como por un aumento significativo en la eficiencia muscular.

De acuerdo con una realización de uso anterior, el nitrato y el nitrito se utilizan en un intervalo de relación de dosis de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1 (nitrato:nitrito), tal como 5:1, 10:1, 30:1, 50:1, 70:1 y 100:1. Preferentemente, la relación de dosis es de aproximadamente 10:1.

De acuerdo con una realización particular, dicho nitrito inorgánico se utiliza solo, sin la presencia de nitrato.

De acuerdo con una realización de la invención, la fuente de nitrato/nitrito inorgánico se selecciona entre un concentrado o un extracto de verduras que contienen nitrato, o un nitrato inorgánico o sal de nitrito. Ejemplos de sales de nitrato y nitrito incluyen, pero no se limitan a sodio, potasio, calcio, zinc, arginina, y amonio. Ejemplos de vegetales ricos en nitratos son verduras de hoja verde, espinaca, remolacha, hinojo, lechuga, col y similares. Como fuentes adecuadas de nitrato se contemplan zumos, pastas, concentrados, etc. de dichos vegetales.

También se pueden utilizar combinaciones de sales de nitrato y nitrito. De acuerdo con una realización, el nitrato y el nitrito se administran por vía oral en un intervalo de relación de dosis de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1 (nitrato:nitrito), tal como 5:1, 10:1, 30:1, 50:1, 70:1 y 100:1. Preferentemente, la relación de dosis es de aproximadamente 10:1. Esto proporcionará los efectos agudos del nitrito tan pronto como se absorba, y a continuación proporciona un efecto sostenido del nitrato después de su bioconversión en nitrito.

En otra realización más, se utiliza nitrato y/o nitrito inorgánico junto con polifenoles. Las características y efectos promotores de la salud de los polifenoles se han descrito anteriormente. La relación de la composición de nitrato y/o nitrito inorgánico:compuesto rico en polifenoles se debe seleccionar para obtener suficiente suministro de nitrato/nitrito. Por tanto, la composición que comprende nitrato/nitrito debe ser de al menos aproximadamente el 10 %, preferentemente de al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente de al menos aproximadamente el 30 %, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente el 40 % y lo más preferentemente de al menos aproximadamente el 50 % o incluso más.

Ejemplos de frutas y zumos de frutas ricos en polifenoles que se pueden utilizar son, pero no están limitados a, manzana, pera, uva, limón, naranja, lima, melocotón, granada, pomelo, kiwi, piña y jengibre. También se pueden utilizar bayas y zumo de bayas tales como, pero no limitados a, moras, frambuesas negras, arándanos, arándanos agrios, frambuesas rojas, cerezas, berenjenas, arándanos rojos, saúco negro, cornijuelo negro, grosella negra, arándanos, moras y fresas. Otras fuentes naturales de polifenoles incluyen, pero no se limitan a, verduras tales como zanahorias, chile, ruibarbo, cebolla. Además, los productos de cacao (ricos en flavonoides), té verde o negro, nueces, yerba mate y el café son todos ricos en polifenoles. En una forma de realización preferida se utiliza remolacha (tal como zumo de remolacha) como fuente de nitrato inorgánico junto con uno o varios productos ricos en polifenoles. La relación de zumo de remolacha: compuesto rico en polifenoles se debe seleccionar para obtener suficiente suministro de nitrato y, por tanto, la parte de zumo de remolacha debe ser de al menos aproximadamente el 10 %, preferentemente de al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente de al menos aproximadamente el 30 %, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente el 40 % y lo más preferentemente de al menos aproximadamente el 50 %.

En otra realización de la presente invención se utilizan bacterias no patógenas en combinación con nitrato y/o nitrito inorgánico o la composición que contiene una mezcla de nitrato y/o nitrito inorgánico y compuestos ricos en polifenoles. La combinación con las bacterias puede estar en forma de bebida tal como un zumo, un yogur, una bebida a base de leche o cualquier otro producto alimentario fermentado. La combinación con bacterias también se puede incluir en diferentes tipos de productos alimentarios funcionales. Las bacterias adecuadas son las denominadas bacterias probióticas, incluidas pero no limitadas a las especies de lactobacilos (por ejemplo *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*) y bifidobacterias, por ejemplo, pero no limitado a, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. lactis* y levaduras probióticas tales como *Saccharomyces boulardii*. Las bacterias no patógenas adecuadas son, por ejemplo, pero no se limitan a, especies de *Staphylococcus*, especies de *Actinomyces* y especies de *Rothia*. Estos microorganismos se pueden usar también en "forma seca".

La contaminación de un alimento o bebida que contiene nitrato con bacterias puede resultar en una gran acumulación de nitrito, debido a las enzimas bacterianas reductoras de nitrato. La ingestión de altos niveles de nitrito puede causar metahemoglobinemia potencialmente grave. En una realización se utiliza una composición rica en nitrato junto con un compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano. Dicho compuesto se debe seleccionar a fin de no afectar negativamente al sabor del producto. Idealmente, debe mejorar el sabor y al mismo tiempo aumentar la bioactividad del producto. Una opción es acidificar el zumo de manera que el pH final sea inferior a aproximadamente 5, y más preferentemente entre aproximadamente pH 2-4. Esto inhibe y/o suprime el crecimiento bacteriano. Los agentes acidificantes adecuados pueden ser cualquier agente que reduzca el pH e incluyen compuestos artificiales, así como zumos naturales de, por ejemplo, pero no limitado a, limón o lima, ácido ascórbico, ácido acético o vinagre (de manzana, uvas u otras frutas). Se contempla que con el uso de productos naturales se consiga un doble efecto. Además de tener un efecto antibacteriano, son ricos en polifenoles, lo que mejora la generación de NO bioactivo a partir de nitrato/nitrito en la bebida de vegetales. En una realización particular, se utiliza un zumo vegetal rico en nitrato (por ejemplo, el zumo de remolacha) junto con un compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano.

En otra realización de la presente invención se utiliza una baja concentración de etanol junto con nitrato y/o nitrito inorgánico. Por ejemplo, si la composición de la invención está en forma de líquido, el contenido de etanol debe estar por debajo de aproximadamente el 5 % (v/v), más preferentemente por debajo de aproximadamente el 2 % (v/v), y lo más preferentemente entre aproximadamente el 0,5 y el 1 % (v/v).

En otra realización más de la presente invención, se utiliza una sal de nitrato y/o nitrito (por ejemplo nitrato de potasio o nitrato de amonio) o una fuente de nitrato natural, incluyendo un polvo vegetal seco, en combinación con regaliz, por ejemplo regaliz salado (cloruro de amonio). También se prefiere el uso de los polifenoles a esta combinación. En particular, se puede usar una sal tal como nitrato de potasio, nitrato de sodio o nitrato de amonio para reemplazar en parte o en su totalidad el contenido de sal (tales como cloruro de sodio o cloruro de amonio) del producto de regaliz.

La composición de la presente invención se puede fabricar en líquidos, pastas, barras, polvos, granulados, tabletas efervescentes, comprimidos, cápsulas, pastillas, goma de mascar, pastillas u obleas de fusión rápida, comprimidos sublinguales, un aerosol o similares, utilizando métodos convencionales puestos en práctica en la industria alimentaria, de dulces y farmacéutica.

Además, la composición también se puede fabricar en forma de o como parte de un producto alimentario, tal como un líquido, una pasta, una barra, una torta, un polvo o un granulado. Por ejemplo, puede estar en forma de producto de alimento fermentado, un alimento funcional, o una bebida deportiva o similar, como se ha mencionado anteriormente. Otra composición es un tabaco sin humo libre de nicotina y/o rapé húmedo. Dichos productos deben fabricarse usando métodos convencionales puestos en práctica en la industria de alimentos y bebidas, o en la industria farmacéutica.

En una realización de la presente invención se utiliza un nitrato y/o nitrito inorgánico en combinación con un producto de cacao tal como chocolate negro que es rico en flavonoides. Un compuesto rico en nitrato preferido en esta realización es el ruibarbo.

En otra realización adicional se utiliza de nitrato y/o nitrito inorgánico en combinación con un compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano. Una opción es acidificar el zumo de manera que el pH final sea inferior a aproximadamente 5, y más preferentemente entre aproximadamente pH 2-4. Esto inhibe y/o suprime el crecimiento bacteriano. Los agentes acidificantes adecuados pueden ser cualquier agente que reduzca el pH e incluyen compuestos artificiales, así como zumos naturales de, por ejemplo, pero no limitado a, limón o lima, ácido ascórbico, ácido acético o vinagre (de manzana, uvas u otras frutas). Se contempla que con el uso de productos naturales se consiga un doble efecto. En una realización particular, se utiliza un zumo vegetal rico en nitrato (por ejemplo, zumo de remolacha) en combinación con un compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano.

Los inventores también ponen a disposición un método para mejorar no terapéuticamente el rendimiento de un mamífero, en el que el nitrato y/o nitrito inorgánico se administra a dicho mamífero. Dicho mamífero se selecciona entre un ser humano, un caballo, o un perro, preferentemente un ser humano. Preferentemente, la dosis de nitrato es de aproximadamente 1-1000  $\mu\text{mol}$  de nitrato de sodio /kg de peso corporal/día. Correspondientemente, la dosis de nitrito preferentemente es de aproximadamente 0,1 a 100  $\mu\text{mol}$ /kg de peso corporal/día.

Más específicamente, para el uso de una sal de nitrato por vía oral, la dosis es de 0,01 a 10 mmol/kg/24 h, incluso más preferentemente 0,1 a 1 mmol/kg/24 h. Correspondientemente, la dosis de nitrito es de 0,001-1 mmol/kg/24 h y más preferentemente de aproximadamente 0,0001-0,1 mmol/kg/24 h.

De acuerdo con una realización de la invención, el nitrato y el nitrito se administran en un intervalo de relación de dosis de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 100:1 (nitrato:nitrito), tal como 5:1, 10:1, 30:1, 50:1, 70:1 y 100:1. Preferentemente, la relación de dosis es de aproximadamente 10:1.

De acuerdo con una realización particular, solamente se administra nitrito.

En aún otra realización del método de la invención el nitrato y/o nitrito inorgánico se administra junto con polifenoles. Las características y los efectos promotores de la salud de los polifenoles se han descrito anteriormente. La relación de la composición de nitrato y/o nitrito inorgánico: compuesto rico en polifenoles se debe seleccionar para obtener un suministro de nitrato suficiente. Por tanto, la composición que comprende nitrato/nitrito debe ser de al menos aproximadamente el 10 %, preferentemente de al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente de al menos aproximadamente el 30 %, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente el 40 % y lo más preferentemente de al menos aproximadamente el 50 % o incluso más. Ejemplos de productos ricos en polifenoles que se pueden administrar se han descrito anteriormente.

En otra realización de la presente invención se administran bacterias no patógenas en combinación con nitrato y/o nitrito inorgánico o la composición que contiene una mezcla de nitrato y/o nitrito inorgánico y compuestos ricos en polifenoles. Los ejemplos no limitantes de bacterias adecuadas para la administración se han descrito anteriormente.

En otra realización del método de la invención el nitrato y/o nitrito inorgánico se administra junto con una baja concentración de etanol. Por ejemplo, si la composición de nitrato y/o nitrito inorgánico de la invención está en forma líquida, el contenido de etanol debe estar por debajo de aproximadamente el 5 % (v/v), más preferentemente por debajo de aproximadamente el 2 % (v/v), y lo más preferentemente entre aproximadamente el 0,5 y el 1 % (v/v).

En aún otra realización de la presente invención, se administra una sal de nitrato o nitrito (por ejemplo nitrato de potasio o nitrato de amonio) o una fuente de nitrato natural, incluyendo un polvo vegetal seco, en combinación con regaliz, por ejemplo, regaliz salado (cloruro de amonio). También se prefiere la administración de los polifenoles a esta combinación. En particular, se puede usar una sal tal como nitrato de potasio, nitrato de sodio o nitrato de amonio para reemplazar en parte o en su totalidad el contenido de sal (tal como cloruro de sodio o cloruro de amonio) del producto de regaliz.

En una realización de la presente invención se administra un nitrato y/o nitrito inorgánico en combinación con un producto de cacao tal como chocolate negro que es rico en flavonoides. Un compuesto rico en nitrato preferido en esta realización es el ruibarbo.

Hay razones para creer que los efectos observados del nitrato sobre el rendimiento físico implican una reducción inicial de nitrato a nitrito. Se cree que el propio nitrato es biológicamente inerte y no puede ser metabolizado por las células de mamíferos. Sin embargo, después de la ingestión el nitrato vuelve a entrar en la boca a través de las glándulas salivales y se reduce con eficacia por bacterias comensales, formando de ese modo el nitrito. En contraste con el nitrato recientemente se ha demostrado que el ion nitrito posee una amplia gama de actividades biológicas.

Los inventores observaron un aumento de nitrito de plasma después del período de tratamiento de nitrato confirmando de ese modo la reducción in vivo de nitrato como se ha descrito previamente (Lundberg y Govoni 2004, LARSEN, F.J, et al. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *N Engl J Med.* 2006, vol. 255, n.º 26, p. 2792-3). Otro hallazgo en apoyo de que el nitrito es bioactivo fue su consumo efectivo durante el ejercicio en contraste con los niveles inalterados del nitrato de plasma. En última instancia la bioactividad del nitrito está probablemente relacionada con su reducción posterior a NO y, posiblemente, a otros intermedios de nitrógeno estrechamente relacionados. Además, recientemente se ha sugerido que el propio nitrito puede afectar directamente a las vías de señalización celulares (Bryan, NS, et al. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* 2006, vol. 1, n.º 5, p. 290-7). Aunque poco probable, en esta primera etapa no se pueden excluir los efectos del propio ion nitrato. Hay varias maneras principales por las que los efectos biológicos de los óxidos de nitrógeno se pueden propagar, incluyendo la alteración de la función de proteínas por nitrosilación, nitración o la unión directa a los restos de proteína heme como en la activación prototípica de la guanilil ciclasa por el NO.

Estudios anteriores utilizando inhibidores de la NOS para bloquear la producción de NO endógeno dan algunas indicaciones. Se ha demostrado que la inhibición de la NOS aumenta el VO<sub>2</sub> submáximo en los perros durante el ejercicio, con independencia de la reducción del flujo sanguíneo (SHEN, W, et al., An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation.* 15 de dic de 1995, vol. 92, n.º 12, p. 3505-12, ISHIBASHI, Y, et al. ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels, adenosine and NO-mediated mechanisms account for coronary vasodilation during exercise. *Circulation Res.* 1998, n.º 82, p. 346-359; Shen et al. 1999, supra). El aumento de VO<sub>2</sub> durante el bloqueo de la NOS se ha explicado por el hecho de que el NO afecta a la respiración tisular por la inhibición reversible de la enzima respiratoria citocromo c oxidasa (Carr & Ferguson 1990, supra; Bolaños et al. 1994, supra; Brown & Cooper 1994, Cleeter et al. 1994, Schweizer y Richter 1994). Otros han relacionado el aumento de VO<sub>2</sub> durante el bloqueo de la NOS con un efecto inhibidor del NO sobre la fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna (BOHUSLAVS'KYI, A, et al. Effect of nitric oxide on the efficiency of oxygen consumption by the working skeletal muscle in fatigue. *FiziolZh.* 2005, vol. 51, n.º 1, p. 33-42; NAVET, R, et al. Proton leak induced by reactive oxygen species produced during in vitro anoxia/reoxygenation in rat skeletal muscle mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2006, vol.38, n.º 1, p. 23-32; WANG, G, et al. Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition. *Am J*



Physiol Heart Circ Physiol. 2005, vol. 288, n.º 3, p. 1290-5). Si los efectos del nitrato se debieron exclusivamente a la inhibición de la citocromo c oxidasa, cabría esperar un aumento en el metabolismo anaeróbico durante el ejercicio físico y una mayor acumulación de lactato. Sin embargo, a juzgar por los resultados este no era el caso, ya que la concentración de lactato en plasma era casi idéntica después de la suplementación de nitrato en comparación con placebo. Los inventores consideran que esto es muy sorprendente.

Los estudios citados que utilizan inhibidores de la NOS todos implican que el NO endógeno está relacionado en la regulación del consumo de oxígeno, pero ha habido pocos intentos de estudiar el efecto de la administración de NO exógeno. Los estudios con donadores de NO, tales como nitroprusiato y nitroglicerina han mostrado resultados algo divergentes, con una disminución en el  $VO_2$  en algunos casos (RECCHIA, FA, et al., Nitric oxide controls cardiac substrate utilization in; LOKE, K E, et al. Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart. Circulation. 21 de Sept de 1999, vol. 100, n.º 12, p. 1291-7), sin efecto en un estudio (NUNEZ, C, et al. Discrepancies between nitroglycerin and NO-releasing drugs on mitochondrial oxygen consumption, vasoactivity, and the release of NO. Circ Res. 11 de nov de 2005, vol. 97, n.º 10, p.1063-9) y aumentos en otras configuraciones (DE BACKER, D, et al. Effects of dobutamine on the relationship between oxygen consumption and delivery in healthy volunteers: comparison with sodium nitroprusside. Clin Sci (Lond). 1996, vol.90, no.2, p.105-11).

Varios de los mecanismos propuestos para la reducción del nitrito a NO descritos anteriormente teóricamente podrían entrar en juego durante el ejercicio físico. Por lo tanto, todas estas vías mejoran en gran medida durante la hipoxia y cuando el pH disminuye, tal como en un músculo activo. Shiva y sus colaboradores demostraron muy recientemente la reducción de nitrito a NO dependiente de desoxihemoglobina en homogeneizados de corazón de rata con una inhibición concomitante de la respiración mitocondrial (Shiva et al. 2007, supra). Otra vía posible incluye la formación de NO por las propias mitocondrias (KOZLOV, AV, et al. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. FEBS Lett. 2 de jul de 1999, vol. 454, n.º 1-2, p. 127-30) o incluso una simple reducción ácida de nitrito en el músculo activo (Zweier et al. 1995, supra, MODIN, A, et al. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. Acta Physiol Scand. 2001, vol. 171, n.º 1, p. 9-16). Cosby y sus colaboradores describieron la formación de NO y la vasodilatación por la reacción de iones nitrito en circulación con desoxihemoglobina en la sangre (COSBY, K, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Nat Med. 2003, vol. 9, n.º 12, p. 1498-505). Aunque esta última vía, y posiblemente también la reducción de nitrito tisular, muy bien podría explicar la reducción inducida por nitrato descrita recientemente en la presión arterial en reposo (Larsen et al. 2006), todavía no es evidente cómo este NO también disminuiría el consumo de oxígeno en el músculo activo. Por lo tanto, una inhibición eficaz de la respiración mitocondrial, por ejemplo, por NO derivado de la desoxihemoglobina, de nuevo cabría esperar que produjese la acumulación de lactato en plasma, que no era el caso.

La eficiencia de los músculos para producir trabajo se ha relacionado con el porcentaje de fibras musculares de tipo I (COYLE, E F, et al. Cycling efficiency is related to the percentage of type I muscle fibers. Med Sci Sports Exerc. 1992, vol. 24, n.º 7, p. 782-8) y el contenido de la proteína 3 de desacoplamiento (UCP3) de las fibras musculares (MOGENSEN, M, et al. Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibers but not to mitochondrial efficiency. J Physiol. 2006, vol. 571, n. 3, p. 669-681). Otros factores que podrían contribuir a la eficiencia del movimiento son las características anatómicas, bioquímicas y biomecánicas (WILLIAMS, K R. The relationship between mechanical and physiological energy estimates. Med Sci Sports Exerc. 1985, n.º 17, p. 317-25). Por lo tanto, la simple medición de las diferencias en el  $VO_2$  a diferentes cargas de trabajo no es una estimación óptima de la eficiencia muscular debido a que la producción de energía para una determinada  $VO_2$  depende de la utilización de sustratos. Los cálculos de eficiencia bruta (GE) incluyen posibles cambios en la relación de intercambio respiratorio y por lo tanto tienen en cuenta la utilización de sustratos. La mejora de la GE después de la suplementación con nitrato indica una mayor eficiencia, pero aun así, no se puede excluir que esta mejora de la eficiencia se origine en un gasto energético basal reducido (EE). Los cálculos de la eficiencia delta (DE) no dependen del EE basal y también se basan en todas las cargas de trabajo en conjunto en lugar de una única carga de trabajo a la vez como en los cálculos de la GE. Por lo tanto es plausible esperar que DE sea la estimación más válida de la eficiencia muscular en este caso. De hecho, incluso DE mejoró significativamente después de la administración de suplementos de nitrato. Es poco probable que la mejora en la eficiencia por el nitrato provenga de factores mecánicos. Los sujetos de este estudio eran todos ciclistas con muchos años de experiencia de entrenamiento y de competición. Es improbable que un par de visitas al laboratorio cambiaran su eficiencia de pedaleo en ningún grado significativo. Sobre todo, dado que los sujetos usaron las mismas zapatillas de ciclismo, pedales automáticos y la misma posición de pedaleo a la que estaban acostumbrados durante el entrenamiento, lo hace aún más improbable. Más importante, el procedimiento de asignación al azar utilizado en este estudio excluye cualquier de dichas diferencias. Marcheal y Gailly (MARCHEAL, G, et al. Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. CellMolLife Sci. 1999, no.55, p.1088-1102) demostró una velocidad de relajación de las fibras musculares más rápida en experimentos *in situ* durante la administración de un donador de NO, implicando así un efecto modulador neuromuscular del NO. Queda por demostrar si esto puede mejorar la eficiencia muscular durante el pedaleo.

El hallazgo de que el pulso de oxígeno a una carga de trabajo determinada disminuye con la administración de suplementos de nitrato es un efecto directo de la menor demanda de oxígeno a esa carga de trabajo. Sin embargo, no hay ninguna diferencia en el pulso de oxígeno a una absorción de oxígeno absoluto determinada. La falta de

efecto del nitrato sobre el  $VE/VO_2$  o el pulso de oxígeno indica que la mejora de la eficiencia tiene su origen en adaptaciones musculares o mitocondriales más que en adaptaciones centrales en el corazón o los pulmones.

En resumen, los presentes resultados demuestran un coste de oxígeno más bajo durante el trabajo submáximo después de la suplementación dietética con nitrato, en cantidades alcanzables a través de la ingesta de una cantidad no tóxica de nitrato. Esto ocurrió sin un aumento acompañante en el lactato en plasma, lo que indica que la producción de energía se había vuelto más eficiente. El mecanismo de acción y las dianas principales deben ser aclaradas, pero el proceso implica probablemente la reducción *in vivo* de nitrato en óxidos de nitrógeno bioactivos, incluyendo el nitrito y el NO.

## Ejemplos

### Métodos

#### Sujetos

Nueve hombres ( $28 \pm 6$  años) sanos bien entrenados ( $VO_{2\text{pico}} 55 \pm 3,7 \text{ ml} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ) se ofrecieron como voluntarios para el estudio. Todos los sujetos eran ciclistas o triatletas entrenados y muy acostumbrados a los procedimientos de ensayo. Los investigadores en este estudio optaron por utilizar sujetos bien entrenados para evitar los efectos del entrenamiento en las pruebas tales como un mayor  $VO_{2\text{pico}}$  o una mejor eficiencia mecánica durante el ejercicio submáximo. El protocolo fue aprobado por el comité de ética regional en Estocolmo y todos los sujetos dieron su consentimiento por escrito antes de la participación.

#### Suplementación dietética con nitrato

El objetivo del presente estudio era investigar los efectos de dos patrones dietéticos distintos, uno con una ingesta de nitrato más alta, y uno con una ingesta de nitrato más baja de lo normal. El estudio presentaba un diseño cruzado doble ciego controlado con placebo. Durante dos períodos de tres días, separados por un intervalo de lavado de diez días, los sujetos fueron instruidos para evitar todos los alimentos con un contenido de nitrato moderado o alto (todos los vegetales, embutidos, fresas, uvas y té). Además, se les pidió que se abstuviesen de alcohol y tabaco. Por lo demás, eran libres de comer cualquier alimento que quisiesen durante los tres días de dieta restringida. Los sujetos se asignaron al azar para empezar con la ingestión de 0,1 mmol de nitrato de sodio/kg de peso corporal/día disuelto en agua o una cantidad igual de cloruro de sodio (placebo). La dosis diaria se dividió y se ingiere tres veces al día. Las diferentes soluciones no se podían distinguir por el sabor o la apariencia. La dosis diaria de nitrato correspondía a la cantidad que se normalmente encuentra en 150 a 250 gramos de un vegetal rico en nitrato tales como la espinaca, la lechuga o la remolacha (Lundberg et al., 2004, *supra*). La última dosis de nitrato o placebo fue ingerida por la mañana el día de la medición (véanse las principales pruebas a continuación). El orden entre el período de suplementación con nitrato (NIT) y el período de placebo (CON) se equilibró. Durante el período de lavado los sujetos no se adhieren a ningún régimen dietético específico.

### Protocolo experimental

Las mediciones se llevaron a cabo en un cicloergómetro con freno electromagnético (Monark 839E, Varberg, Suecia) que se modificó con un sillín de carreras y el sistema de pedales a los que los sujetos estaban acostumbrados en los entrenamientos. La bicicleta ergométrica estaba controlada por ordenador, lo que permite una carga de trabajo constante, independientemente de la cadencia para pedalear que eligiese el sujeto. La cadencia de pedaleo fue seleccionada individualmente en el rango de 70-90 rpm, pero se mantuvo constante durante el ensayo para minimizar las diferencias en la producción de trabajo debido a cambios en los patrones de reclutamiento muscular.

Se midieron la ventilación pulmonar ( $V_E$ ), el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ), las emisiones de  $CO_2$  ( $VCO_2$ ) y la relación de intercambio respiratorio (RER) a intervalos de 10 segundos por un analizador de gases computarizado (SIMA 2001, Odense, Dinamarca) conectados a un caudalímetro mediante el cual respiraban los sujetos a través de una boquilla y un tubo de plástico. La frecuencia cardíaca (FC) se registró continuamente durante las pruebas con un monitor de ritmo cardíaco portátil Polar (S610, Polar, Kempele, Finlandia). Se recogieron muestras de sangre capilar (20  $\mu\text{l}$ ) de la yema del dedo y se analizaron para el lactato ([Hla]) utilizando un Biosen C-Sport Line Analyser (EKF diagnostics, Magdeburgo, Alemania). Se determinó la concentración de hemoglobina ([Hb]) en reposo con sangre capilar tomada de la yema del dedo y se analizó con un dispositivo de medición de Hb (Hemocue, Ängelholm, Suecia). El hematocrito (Hct) se determinó mediante la centrifugación de sangre capilar a 12.000 rpm durante tres minutos.

#### Pruebas preliminares:

Cada sujeto acudió al laboratorio dos veces en un período de dos semanas antes de las primeras pruebas principales. La primera prueba preliminar se realizó para que el sujeto se familiarizase con el ergómetro de la bicicleta y el procedimiento de prueba. Los sujetos realizaron una prueba preliminar a cinco niveles submáximos con cada nivel que dura cinco minutos. No hubo descanso entre los diferentes niveles submáximos. Se midió el  $VO_2$  de

forma continua con la AMIS 2001. Al final de cada nivel submáximo se tomó sangre capilar de la yema del dedo y posteriormente se analizó para [Hla]. A cada carga de trabajo los sujetos calificaron su esfuerzo percibido en la escala RPE de Borg (Borg, G. Perceived exertion as an indicator of somatic stress. Scand J Rehabil Med. 1970, vol. 2, n.º 2, p. 92-8), se calificaron tanto el esfuerzo central como muscular. Después de ocho minutos de recuperación, se pidió al sujeto que pedalease durante el mayor tiempo posible a una carga de trabajo correspondiente a su absorción máxima de oxígeno calculada (Åstrand, PO, et al. Textbook in work physiology. New York: McGraw-Hill Book Company, 1970. P.619). Durante esta prueba, se midió el  $VO_{2\text{pico}}$  real del sujeto y si el sujeto era capaz de pedalear durante más de siete minutos, se añadió una potencia extra de 20-30 vatios cada minuto hasta el agotamiento. Uno y tres minutos después de la prueba máxima se tomaron muestras de sangre capilar de la punta del dedo para el análisis de [Hla].

Antes de la segunda prueba preliminar, los niveles submáximos se ajustaron de manera que correspondiesen a 45, 60, 70, 80 y 85 % del  $VO_{2\text{pico}}$ . La tasa máxima de trabajo también se ajustó, en caso necesario, de modo que el tiempo hasta el agotamiento se mantuvo entre cuatro y siete minutos.

#### Pruebas principales:

Los sujetos se abstuvieron de hacer mucho ejercicio tres días antes de las pruebas principales y evitaron todo ejercicio el día antes de las pruebas. También se les pidió que comiesen su última comida ligera al menos 3 horas antes del comienzo de las pruebas. Cuando los sujetos llegaron al laboratorio recibieron su última dosis de placebo o nitrato y se les permitió descansar en la posición supina durante 60 minutos antes del comienzo de la prueba.

Todos los sujetos utilizaron un procedimiento de calentamiento normalizado de cinco minutos de pedaleo a 100 vatios, seguido de cinco minutos de descanso. Las pruebas submáximas y máximas se realizaron de la misma manera que la segunda prueba preliminar con cinco cargas de trabajo submáximas de cinco minutos de duración cada una, sin descanso entre los diferentes niveles. Se utilizaron cargas de trabajo idénticas en las dos pruebas principales. Se extrajo sangre venosa (9 ml) en el descanso de 45 minutos después de que se hubo ingerido última dosis de nitrato/placebo y de nuevo inmediatamente después de la prueba de  $VO_{2\text{pico}}$ . La sangre se puso en un baño de hielo y se centrifugó en los siguientes cinco minutos a 1300 rpm y 4 °C. El plasma se separó y se mantuvo a -80 °C hasta que se analizó para determinar sus concentraciones de nitrato y nitrito mediante un ensayo de quimioluminiscencia como se ha descrito previamente (Lundberg 2004, supra).

#### Estadística y cálculos:

Los resultados se expresan como medias  $\pm$  desviación típica (media  $\pm$  SD). Se utilizaron pruebas t pareadas para evaluar la diferencia entre los ensayos con nitrato y con placebo. El nivel de significación se estableció como  $p < 0,05$ .

La eficiencia bruta (GE) se define como la carga de trabajo dividido por el gasto de energía real (EE). El EE a su vez se calcula con la ecuación de Brouwer (Brouwer, E. On simple formulae for calculating the heat expenditure and the quantities of carbohydrate and fat oxidized in metabolism of men and animals, from gaseous exchange (Oxygen intake and carbonic acid output) and urine-N. Acta Physiol Pharmacol Neerl. 1957, n.º 6, p. 795-802). La eficiencia Delta (DE) se define como el aumento de la frecuencia de trabajo dividido por el aumento de EE (Gaesser, GA, et al.). La DE se basó en las cuatro cargas de trabajo más bajas y se analizó mediante regresión lineal. El pulso de oxígeno se define como el  $VO_2/FC$ .

#### Resultados:

##### Presión arterial en reposo:

La presión arterial sistólica media en reposo era más baja después de la administración de suplementos de nitrato ( $112 \pm 8$  mmHg) en comparación con el placebo ( $120 \pm 5,9$ ,  $p < 0,01$ ). La presión arterial diastólica también fue más baja después de la administración de nitrato ( $68 \pm 5,5$  mm Hg) en comparación con el placebo ( $74 \pm 6,8$  mmHg,  $p < 0,01$ ). Partes de estos hallazgos se han publicado como comunicación separada (Larsen et al. 2006).

##### Valores sanguíneos:

No se observó ningún cambio en [Hb] en reposo (NIT  $152 \pm 11$ , CON  $153 \pm 11$  g  $\times$  l<sup>-1</sup>,  $p = 0,87$ ) o inmediatamente después de la prueba de  $VO_{2\text{pico}}$  (NIT  $163 \pm 13$ , CON  $161 \pm 13$  g  $\times$  l<sup>-1</sup>,  $p = 0,27$ ). Tampoco hubo ningún cambio en el valor del hematocrito en reposo (NIT  $42 \pm 4$ , CON  $43 \pm 3$  %,  $p = 0,19$ ) o después de la prueba de  $VO_{2\text{pico}}$  (NIT  $46 \pm 4$ , CON  $47 \pm 4$  %,  $p = 0,6$ ).

Los niveles plasmáticos de nitrato en reposo fueron  $27 \pm 6,9$   $\mu$ M en Con y  $182 \pm 55$  en NIT ( $p = < 0,01$ ). Los niveles de nitrato inmediatamente después de la prueba de trabajo máximo fueron de  $29 \pm 6,1$  en CON y  $175 \pm 61$   $\mu$ M en NIT ( $p = < 0,01$ ). El nitrato en plasma no cambió durante el ejercicio, ya sea en NIT o CON ( $p = 0,8$ ). Los niveles de nitrito en reposo fueron  $124 \pm 28$  en CON y  $226 \pm 87$  nM en NIT ( $p = < 0,01$ ). Inmediatamente después de la prueba

de trabajo máximo los niveles de nitrito fueron  $111 \pm 29$  en CON y  $137 \pm 48$  en NIT ( $p = 0,17$ ). La disminución de las concentraciones de nitrito durante el ejercicio fue más pronunciada en NIT que en CON (Véase Figura 2).

Parámetros de trabajo:

5 Después de la administración de nitratos el  $VO_2$  fue significativamente menor durante las cinco cargas de trabajo correspondientes al 45-80 % del  $VO_{2pico}$  en comparación con el período de placebo (Fig. 3). La diferencia más significativa se observó en el 80 % del  $VO_{2pico}$  (NIT  $3,44 \pm 0,31$  l x  $min^{-1}$  vs CON  $3,61 \pm 0,31$  l x  $min^{-1}$ ,  $p = 0,003$ , Fig 4). En promedio el  $VO_2$  fue de  $0,15$  l x  $min^{-1}$  más bajo en los ensayos NIT sobre las cinco cargas de trabajo submáximas. No hubo diferencias en la frecuencia cardíaca (FC) entre los ensayos NIT y CON (véase Fig. 3). El pulso de oxígeno tiende a disminuir a partir de  $21,0 \pm 2,0$  durante CON a  $20,3 \pm 1,9$  ml x  $latido^{-1}$  ( $p = 0,08$ ). No se encontraron diferencias entre el NIT y CON en [Hla] (Fig 5),  $V_E$ ,  $V_E/VO_2$  o la relación de intercambio respiratorio (RER) durante cualquiera de las cargas de trabajo submáximas. La eficiencia bruta promedio mejoró del 19,7 % durante CON al 21,1 % durante el NIT ( $p = 0,02$ ). La eficiencia Delta (DE) aumentó significativamente del  $22,1 \pm 1,6$  % durante CON en comparación con el  $22,9 \pm 1,9$  % durante NIT ( $p = 0,04$ ).

20 A la carga de trabajo máxima valores de los  $VO_{2pico}$  para los ensayos NIT y Con fue de  $4,49 \pm 0,44$  y  $4,61 \pm 0,28$  l x  $min^{-1}$ , respectivamente. No se observaron diferencias significativas ni en  $V_{E_{max}}$  (NIT  $182 \pm 21,4$  vs  $21,7 \pm$  CON  $186$  l x  $min^{-1}$ ,  $p = 0,5$ ),  $FC_{max}$  (NIT  $189,8 \pm 7,0$  vs CON  $190,3 \pm 7,5$   $latidos \times min^{-1}$ ,  $p = 0,94$ ) o la carga máxima de trabajo (NIT  $360,6 \pm 32,8$  vs  $358,9$  CON  $\pm 32,3$  vatios,  $p = 0,35$ ). No hubo diferencias entre NIT y CON en el índice de esfuerzo percibido (escala RPE de Borg) a cualquier carga de trabajo (submáxima o máxima).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la mejora no terapéutica del rendimiento de un mamífero, dicha mejora del rendimiento que se manifiesta como un menor consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) durante el ejercicio físico, caracterizado por que se administra nitrato inorgánico, nitrito inorgánico o una combinación de los mismos por vía oral, en el que la dosis de nitrato es de 0,01 a 10 mmol de nitrato de sodio/kg de peso corporal/día, la dosis de nitrito es de 0,001 a 1 mmol/kg de peso corporal/día, y en el que el intervalo de la relación de dosis cuando el nitrato y el nitrito se administran en combinación es de 5:1 a 100:1 (nitrato:nitrito), en el que dicho rendimiento se mejora en comparación con el rendimiento físico de dicho mamífero durante dicho ejercicio físico, en ausencia de dicha administración de nitrato y/o nitrito inorgánico.
- 10
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho nitrato y/o nitrito se administra junto con polifenoles.
- 15 3. El uso de nitrato o nitrito inorgánico o una combinación de los mismos para mejorar no terapéuticamente el rendimiento de un mamífero, dicha mejora del rendimiento que se manifiesta como un menor consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) durante el ejercicio físico, caracterizado por que el nitrato, nitrito inorgánico o una combinación de los mismos se administra por vía oral, en el que la dosis de nitrato es de 0,01 a 10 mmol de nitrato de sodio/kg de peso corporal/día, la dosis de es nitrito de 0,001 a 1 mmol/kg de peso corporal/día, y en el que el intervalo de relación de dosis cuando el nitrato y el nitrito se administran en combinación es de 5:1 a 100:1 (nitrato:nitrito), en el que dicho rendimiento se mejora en comparación con el rendimiento físico de dicho mamífero durante dicho ejercicio físico, en ausencia de dicha administración de nitrato y/o nitrito inorgánico.
- 20
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha composición tiene forma de líquido, pasta, barra, torta, polvo, granulado, comprimido efervescente, comprimido, cápsula, gragea, goma de mascar, comprimido u oblea de fusión rápida, comprimido sublingual o aerosol.
- 25
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que dicha composición tiene forma de bebida deportiva, bebida energética, barrita deportiva o barrita energética.
- 30 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que la fuente de nitrato inorgánico se selecciona entre un concentrado, un extracto o un zumo de verduras que contienen nitrato o una sal de nitrato inorgánico.
- 35 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que dicho nitrato inorgánico se utiliza en combinación con polifenoles.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que dicho nitrato inorgánico se utiliza en combinación con bacterias vivas capaces de mejorar la reducción de nitrato o nitrito.
- 40 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que dicho nitrato inorgánico se utiliza en combinación con etanol en una cantidad por debajo del 5 % (v/v), preferentemente por debajo del 2 % (v/v), más preferentemente entre el 0,5-1 % (v/v).

Vasodilatación  
Cardioprotección  
Inhibición de plaquetas

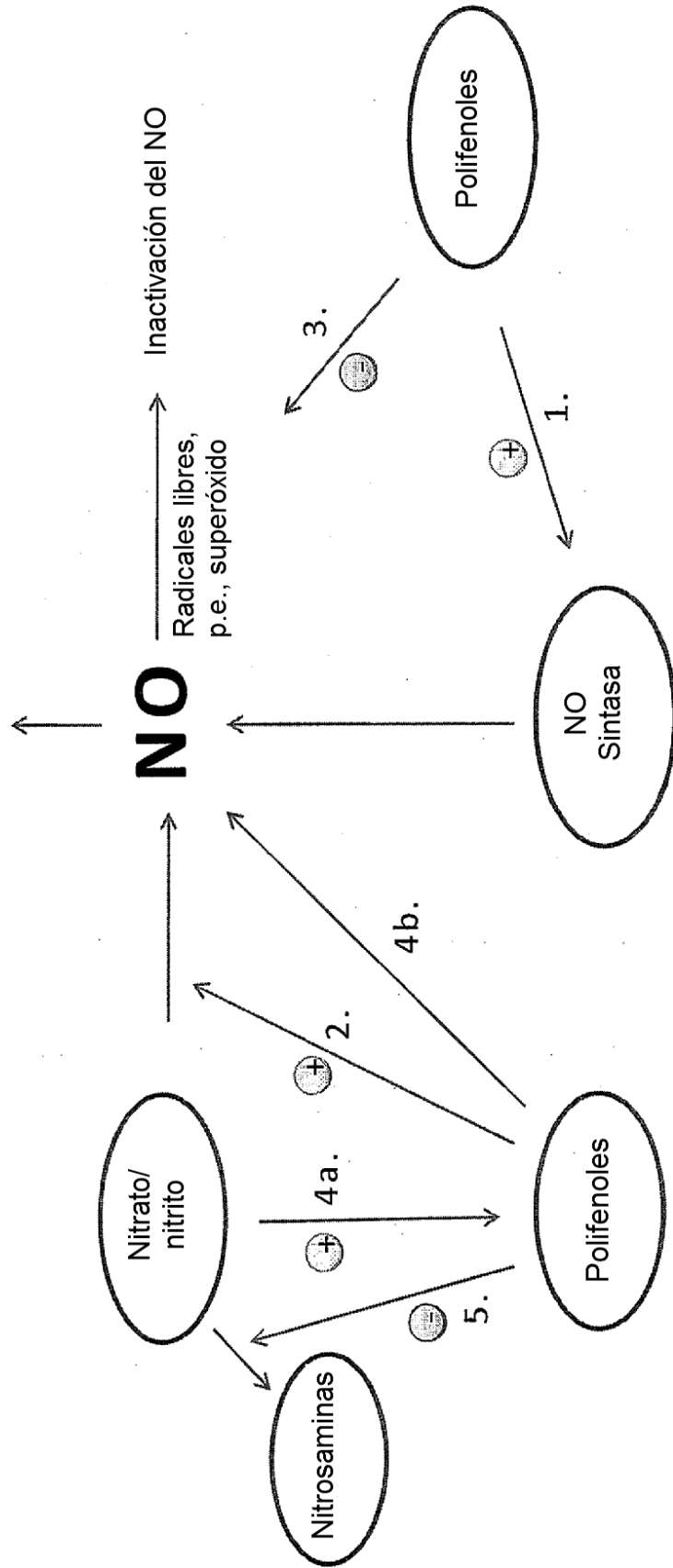


FIGURA 1

FIGURA 2

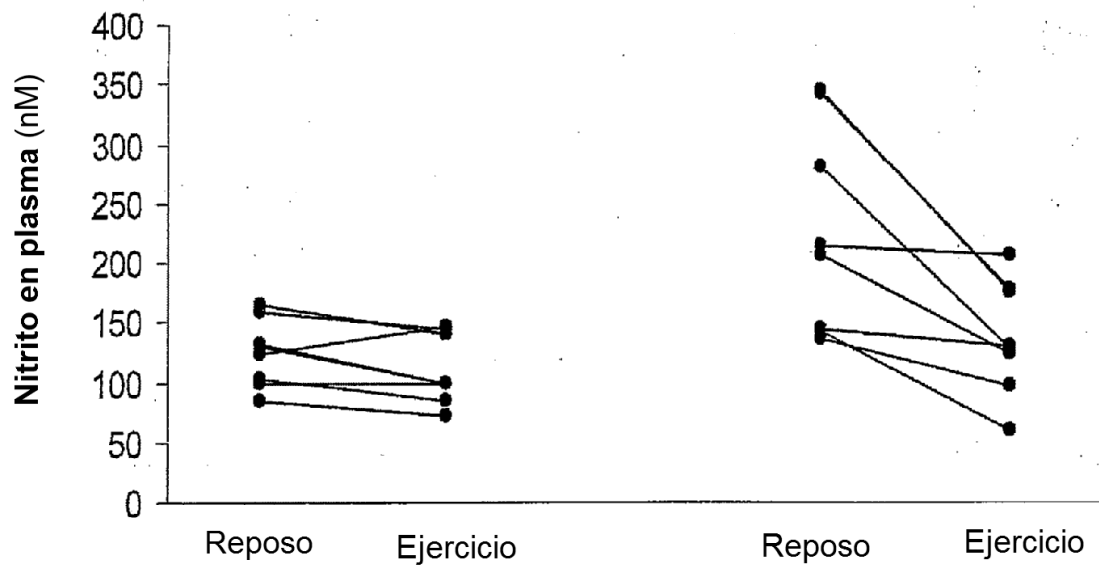


FIGURA 3

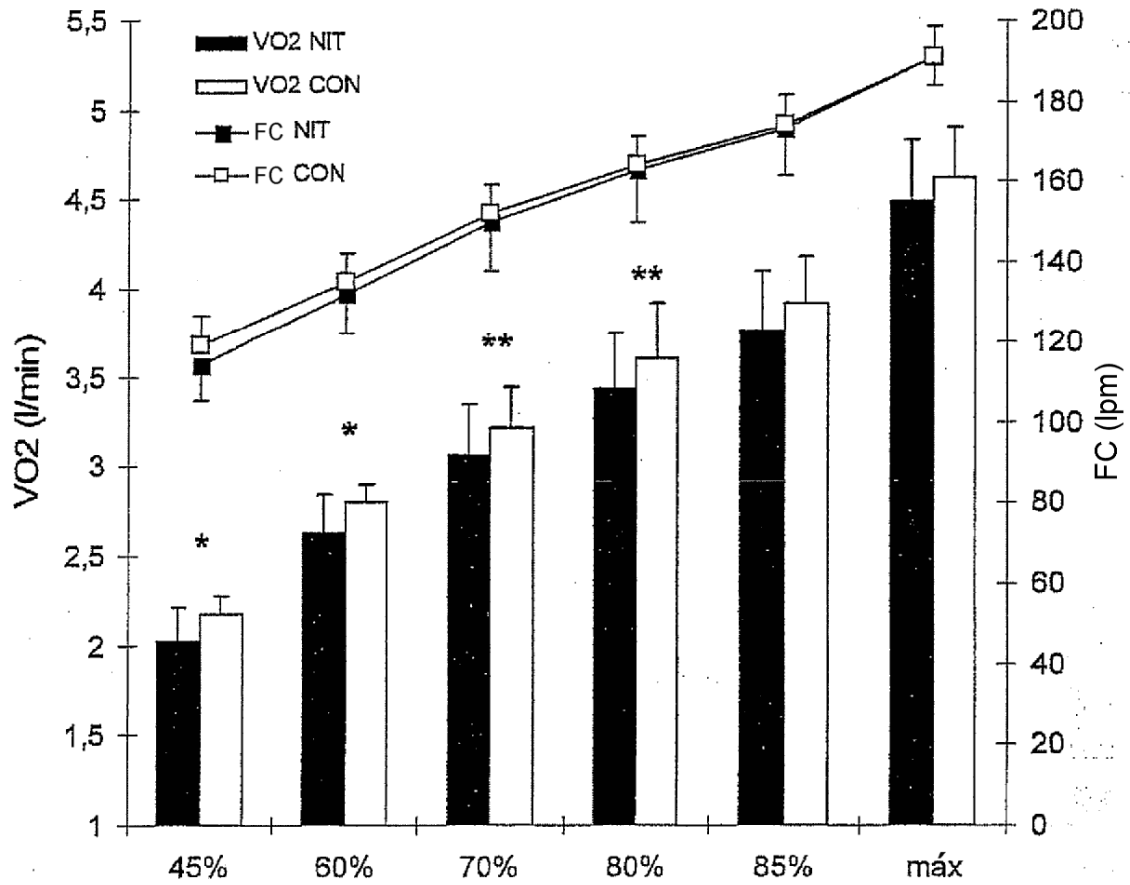




FIGURA 4

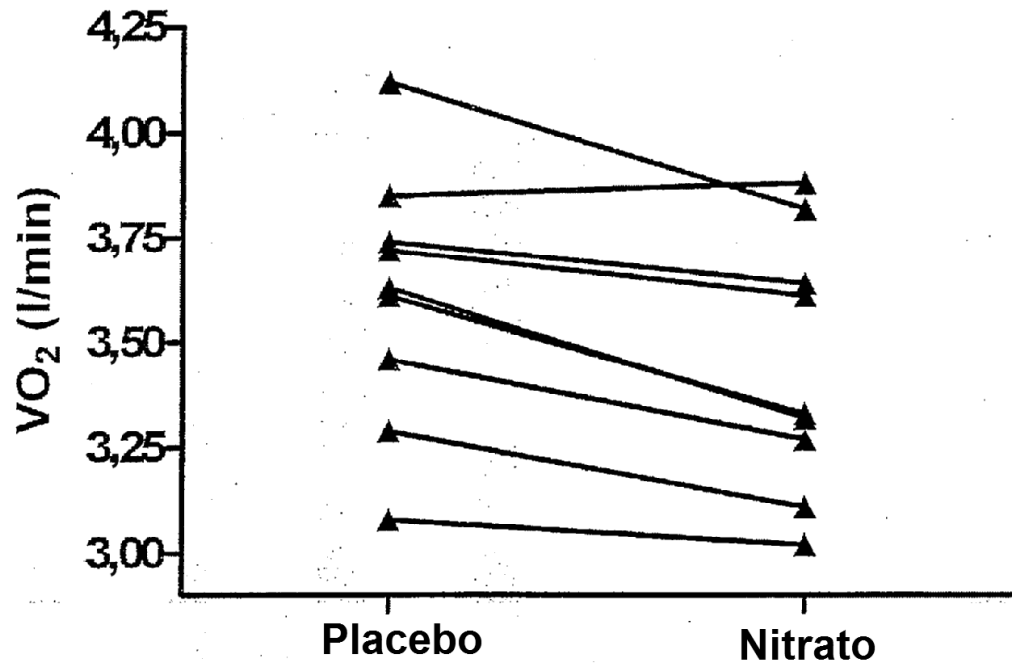


FIGURA 5

