(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 702 047**

(51) Int. CI.:

A23L 33/105 (2006.01)
A23L 33/15 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2005 PCT/EP2005/055987**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2006 WO06053872**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2005 E 05803077 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 1811866**

(54) Título: **Uso de compuestos antioxidantes para el daño muscular**

(30) Prioridad:

16.11.2004 EP 04105813

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2019

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen , NL

(72) Inventor/es:

KIES, ARIE KARST;
RIETJENS, SASKIA JOHANNES;
HAENEN, GUIDO REMBERTUS MICHIEL MARIE y
BAST, AALT

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Uso de compuestos antioxidantes para el daño muscular

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de compuestos antioxidantes para mantener o restaurar la salud muscular. Estos compuestos pueden usarse en la fabricación de una composición para mantener o restaurar la salud muscular, con la que se previene y/o se trata el daño muscular debido al ejercicio. Más específicamente, dicha composición incluye alimentos, bebidas, suplementos y piensos.

Los deportistas realizan un ejercicio muscular regular intenso y/o prolongado. Los estudios sugieren que durante un ejercicio intenso, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se eleva a un nivel que supera los sistemas de defensa antioxidante de los tejidos. El resultado es estrés oxidativo, que puede causar daños en tejidos, por ejemplo en el tejido muscular. En general, una buena condición muscular es de una importancia imperativa para su rendimiento, especialmente en los músculos esqueléticos. Por lo tanto, el ejercicio puede perjudicar la salud muscular, lo que tiene como consecuencia, por ejemplo, fatiga, una menor resistencia, pérdida de la función. Se ha propuesto el uso de suplementos antioxidantes para prevenir dichos daños (Dietary anti-oxidants and exercise, Journal of Sports Sciences, 2004, 22, 81-94, Powers et al.).

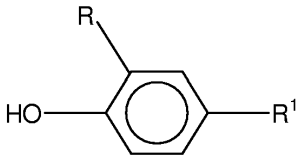
El documento US-B1-6 399 116 describe composiciones (bebidas, alimentos o suplementos nutricionales) que contienen salidrosida y tirosol con antioxidante adicional (vitamina C) para tratar la fatiga muscular. El documento SU 1 787 420 describe suplementos nutricionales que comprenden oleuropeína e hidroxitirosol que pueden atravesar la barrera sangre:cerebro y proteger el tejido cerebral frente al fenómeno oxidativo, en particular frente a enfermedades neurodegenerativas.

Sin embargo, no todos los antioxidantes son adecuados para la recuperación del daño muscular. Los estudios han demostrado que algunos antioxidantes no proporcionan casi ningún efecto. Esto puede tener varias razones. En primer lugar, la biodisponibilidad de los antioxidantes puede ser reducida. La absorción de los antioxidantes por los intestinos es entonces relativamente baja, lo que tiene como consecuencia la necesidad de una alta cantidad de antioxidante para que sea eficaz. En segundo lugar, no todos los antioxidantes pueden atravesar la membrana de las células musculares. Además, algunos antioxidantes se agotan con el uso, lo que también requiere la ingesta de una cantidad relativamente alta de antioxidantes para observar algún efecto. Esto no es deseable, no solo desde una perspectiva de salud (muchos metabolitos en el cuerpo) sino también desde la perspectiva de los costes.

Se sabe que algunos antioxidantes se regeneran en la denominada red antioxidante, por ejemplo, la regeneración de vitamina E por vitamina C. Sin embargo, los estudios *in vivo* con respecto a la vitamina E no han mostrado ningún efecto significativo sobre marcadores antioxidantes.

El objeto de la invención consiste en proporcionar un componente adecuado para la recuperación muscular, que pueda tomar parte en la red antioxidante y que tenga una buena biodisponibilidad.

La invención se define mediante las reivindicaciones. Sorprendentemente, se ha encontrado que puede utilizarse un compuesto comestible según la fórmula (1) en el tratamiento del daño muscular debido al ejercicio.



(1)

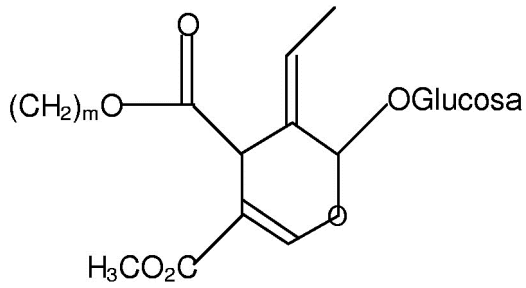
en la que:

R puede ser H, OH o CH_3O;

R^1 puede ser H o $(CH_2)_nOR^2$

en la que: n es 1, 2 o 3

R^2 es H, $COCH_3$ o



en la que m es 1, 2 o 3

con la condición de que R y R^1 no sean H al mismo tiempo.

Algunos ejemplos de compuestos adecuados según la fórmula (1) son hidroxitirosol y su acetato, oleuropeína, tirosol y su acetato, alcohol homovanílico y/o catecol. También se pueden utilizar mezclas de estos compuestos.

Se ha descubierto, sorprendentemente, que este compuesto puede regenerarse mediante el uso de vitamina C. Esto hace que el compuesto según la fórmula (1) sea adecuado para su uso en la fabricación de una composición para prevenir o tratar el daño muscular debido al estrés oxidativo.

Preferentemente, R es OH. De forma más preferida, se utiliza al menos hidroxitirosol o su acetato en la composición. El hidroxitirosol tiene la ventaja adicional de que es anfifílico. Puede disolverse tanto en composiciones acuosas como en composiciones grasas, por ejemplo en fluidos y membranas intracelulares y extracelulares.

El compuesto según la fórmula 1 puede utilizarse para la fabricación de una composición para tratar o prevenir el daño muscular debido al ejercicio. Esta composición no comprende salidrosida.

Otro aspecto de la invención es el uso según la invención, en el que el componente adecuado para la recuperación muscular se utiliza en un producto nutricional adecuado para el consumo humano. Cualquier producto nutricional puede ser adecuado, por ejemplo, un alimento, una bebida o un suplemento dietético. El producto nutricional no es una goma de mascar.

Preferentemente, el compuesto antioxidante según la fórmula (1) está presente en productos nutricionales deportivos para su consumo por deportistas. Se sabe que los deportistas pueden beneficiarse de alimentos o ingredientes alimentarios particulares que superan las directrices dietéticas recomendadas para la población general. La expresión "productos nutricionales deportivos" se utiliza en el presente documento para indicar cualquier alimento o bebida especialmente adaptado para deportistas.

Existen varios tipos de alimentación deportiva adecuados para los fines de la invención, por ejemplo, suplementos dietéticos específicos, bebidas deportivas o alimentos deportivos.

Las bebidas deportivas pueden ser hipotónicas, hipertónicas o isotónicas. Las bebidas deportivas pueden estar disponibles en forma líquida, como concentrados o en forma de polvos (para su disolución en un líquido, tal como, por ejemplo, agua). Los alimentos deportivos pueden encontrarse en forma de barras, tabletas y geles. El suplemento dietético puede encontrarse en forma de una píldora o una cápsula.

La alimentación puede comprender además aditivos habituales, por ejemplo, edulcorantes, aromas, azúcar, grasa, emulsionantes, conservantes. La alimentación también puede comprender otros componentes activos, tales como proteínas (hidrolizadas) tal como se describe en el documento WO02/45524. También pueden estar presentes otros antioxidantes en la alimentación, por ejemplo flavonoides, carotenoides, ubiquinonas, rutina, ácido lipoico, catalasa, glutatión (GSH) y vitaminas, tales como, por ejemplo, vitaminas C y E o sus precursores. La combinación de un compuesto según la fórmula 1 y vitamina C o su precursor ha mostrado un efecto sinérgico. Preferentemente, el hidroxitirosol o su acetato se combina con vitamina C. Una composición que comprende un compuesto según la fórmula 1 y vitamina C es novedoso y es otro aspecto de la invención.

El compuesto según la fórmula 1 debe estar presente en una cantidad eficaz. En general, se precisa entre 1 mg y 3 gramos del compuesto por ración para que surta un efecto, preferentemente de 10 mg a 1 gramo por ración. Esto depende de una serie de factores, tales como el peso, la edad, los hábitos dietéticos y la intensidad del ejercicio. El efecto de un antioxidante puede medirse por medio de determinados marcadores. En el ejercicio muscular se produce tanto la oxidación de lípidos como la oxidación de proteínas. Los marcadores adecuados para medir la cantidad de oxidación de lípidos son, por ejemplo, malondialdehído (MDA) e isoprotanos. Algunos marcadores adecuados para la cantidad de oxidación de proteínas son, por ejemplo, carbonilos de proteínas.

La alimentación que comprende el compuesto según la fórmula (1) se puede ingerir antes, durante o después del ejercicio. En caso de que se use antes del ejercicio, se ingiere preferentemente aproximadamente una hora antes. En caso de que se use después del ejercicio, se ingiere preferentemente dentro de un periodo de una hora después, de forma más preferida inmediatamente después del ejercicio.

Además de productos nutricionales adecuados para el consumo humano, también es posible utilizar el compuesto según la fórmula (1) en piensos para animales, incluido el pienso para mascotas. Entonces es especialmente adecuado para animales que se emplean por su fuerza muscular, por ejemplo, caballos o perros (de raza) (es decir, perros de raza o perros de trineo).

La invención se ilustra a continuación con los ejemplos no limitantes siguientes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Experimentos de baño de órganos

Se utilizaron ratas Lewis macho (de entre 12 y 14 semanas de edad). Después de la decapitación, se extirpó rápidamente el diafragma y se cortaron pequeñas tiras (de aproximadamente 2 mm de ancho y 1 cm de largo) y subisguientemente se montaron en baños de órganos termostatizados, que contenían tampón de Krebs gaseado con una mezcla del 95% de O_2 y el 5% de CO_2, pH 7,4. Cada tira de diafragma estaba conectada verticalmente a un transductor isométrico. La composición del tampón de Krebs era (mM): NaCl (117,5), KCl (5,6), $MgSO_4$ (1,18), $CaCl_2$ (2,5), $NaHPO_4$ (1,28), $NaHCO_3$ (25) y glucosa (5,5). Durante el experimento, el tampón se cambió cada 15 minutos. Se creó estimulación de campo a lo largo de la totalidad de cada una de las tiras de músculo con electrodos de platino.

Al comienzo del experimento, las tiras se lavaron durante 45 minutos a temperatura ambiente para minimizar el deterioro dependiente de la temperatura. Posteriormente, el baño de agua se conectó a 37 ºC (15 minutos antes del inicio de los experimentos). Cada tira se ajustó en primer lugar a su longitud óptima (Lo) utilizando contracciones de fasciculación (1 Hz). La duración del pulso fue siempre de 10 ms.

En primer lugar se determinaron la Pt (tensión de fasciculación a una estimulación de 1 Hz) y la Po (tensión específica máxima a una estimulación de 100 Hz, duración de 250 ms). A continuación, se evaluó la respuesta de las tiras de músculo del diafragma a frecuencias de estímulo crecientes en Lo mediante la aplicación de pulsos de 10, 20, 33, 50 y 100 Hz aplicados en trenes de 250 ms. Se utilizó un período de recuperación de 2 minutos entre contracciones. Al finalizar el protocolo de fuerza-frecuencia, se aplicó un protocolo de fatiga. Las tiras se estimularon durante 6 minutos a 5 Hz.

Después de este protocolo de estimulación, se incubó hidroxitirosol (HT) o control (vehículo, etanol) durante 5 minutos. Subsiguientemente, se incubó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o control (MilliQ) durante 10 minutos. Después de ello se determinaron de nuevo: Pt, Po, fuerza-frecuencia y fatiga.

El hidroxitirosol se adquirió de Cayman Chemical, Ann Arbor, Estados Unidos. El peróxido de hidrógeno se obtuvo de Sigma, St. Louis, Estados Unidos. Todos los demás productos químicos tenían una pureza de grado analítico.

La figura 1 muestra el efecto de H_2O_2 en la fuerza muscular. El H_2O_2 reduce la fuerza de forma dependiente de la dosis en todas las frecuencias de estimulación aplicadas, en comparación con el control. Los datos se expresan como medias, basadas en mediciones al menos por duplicado.

La figura 2 muestra el efecto protector de HT frente al daño muscular mediado por H_2O_2. El HT protege frente al daño muscular mediado por H_2O_2 en todas las frecuencias de estimulación (10, 20, 33, 50 y 100 Hz). Incluso 300 µM de HT sin incubación en H_2O_2 conservan la función muscular. Los datos se expresan como medias, basadas en mediciones al menos por duplicado.

La figura 3 muestra el efecto protector de HT frente al daño muscular mediado por H_2O_2. El HT protege de una forma dependiente de la dosis frente a la disminución de la fuerza inducida por H_2O_2. La frecuencia de estimulación fue de 50 Hz y la concentración de H_2O_2 fue de 1 mM. Los datos se expresan como medias, basadas en al menos 2 mediciones por duplicado.

Ejemplo 2: Experimentos de secuestro y comparación con ácido lipoico.

Materiales

El hidroxitirosol se obtuvo de Cayman Chemical, Ann Arbor, Estados Unidos. El tirosol y el KO_2 se adquirieron de Fluka, Buchs, Suiza. El alcohol homovanílico, el 2-metoxifenol, el fenol y la dihidrorrodamina-123 (DHR-123) se obtuvieron de Sigma, St. Louis, Estados Unidos. El catecol se obtuvo de Janssen Chimica, Geel, Bélgica. El ácido lipoico se adquirió de Asta Medicac AG, Francfort, Alemania. El monóxido de nitrógeno se adquirió de AGA,

Hamburgo, Alemania. Todos los demás productos químicos tenían una pureza de grado analítico.

Secuestro de ONOOH

La protección frente a la oxidación de DHR-123 inducida por ONOOH de los compuestos se midió tal como se describe por Kooy et al (Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radic Biol Med, 16;149-56). En resumen, se incubaron DHR-123 5 µM y diversas concentraciones de un secuestrante en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7,4) a 37 ºC. Subsiguientemente, se añadió ONOOH pipeteando una parte alícuota de 10 µl en el tubo mientras se agitaba en vórtice rápidamente, alcanzando una concentración final 0,7 µM. Las mediciones de fluorescencia se realizaron con longitudes de onda de excitación y emisión de 500 y 536 nm respectivamente. Los efectos se expresan como la concentración del secuestrante que proporciona una inhibición del 50% de la oxidación de DHR-123 (CI50).

Secuestro de $O_2^{\bullet-}$

Se generó $O_2^{\bullet-}$ mediante la reacción de xantina (150 µM) y xantina oxidasa (XO) (5,5 mU/ml) en tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,8). Los radicales $O_2^{\bullet-}$ se detectaron mediante nitroazul de tetrazolio (NBT, 50 µM). El NBT experimenta una reducción mediante $O_2^{\bullet-}$ dando su formazán. Se realizó un seguimiento de la velocidad de esta reducción espectrofotométricamente a 560 nm durante 2 minutos. Se añadieron diversas concentraciones de un secuestrante y se incubaron a 37 ºC. La reacción se inició mediante la adición de XO. El potencial de secuestro de $O_2^{\bullet-}$ se expresa como la concentración del secuestrante que proporciona una disminución del 50% en la reducción de NBT (CI50). Para ajustar un posible efecto inhibidor del secuestrante sobre la actividad de XO, la concentración más elevada del secuestrante se incubó a 37 ºC y subsiguientemente se midió la velocidad de formación de urato a 293 nm durante 2 minutos.

Los resultados de las pruebas de secuestro se muestran a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Actividades de secuestro de ONOO- y $O_2^{\bullet-}$ de los compuestos sometidos a ensayo. Se muestran los valores de CI50 ± SEM (en µM), n = 3.

Compuesto sometido a ensayo	ONOO-	$O_2^{\bullet-}$
Hidroxitirosol	3,6 ± 0,2	2,3 ± 0,3
Oleuropeína	2,3 ± 0,5	6,0 ± 0,5
Tirosol	99 ± 16	> 200
Alcohol homovanílico	6,6 ± 0,2	> 200
Ácido lipoico (ejemplo comparativo)	> 200	> 100

Ejemplo 3: Regeneración de hidroxitirosol (HT) mediante ascorbato

La oxidación de HT (Cayman Chemical, Ann Arbor, Estados Unidos) se realizó a 37 ºC en un tampón de fosfato 145 mM, pH 7,4, que contenía HT 50 µM y 5 U/ml de tirosinasa (Sigma, St. Louis, Estados Unidos). La incubación de tirosinasa y HT conduce a la formación de una quinona (HTQ). Se realizó un seguimiento de las reacciones espectrofotométricamente y mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los espectros se registraron a una velocidad de barrido de 240 nm/min. El análisis por HPLC de las mezclas de incubación se realizó utilizando una columna Supelcosil LC318. La columna se eluyó con agua destilada que contenía el 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético y el 5% (v/v) de acetonitrilo con un caudal de 1 ml por minuto. Se usó detección de matriz de diodos (DAD) a 280 nm. La capacidad del ascorbato para reaccionar con HTQ se determinó de la forma siguiente. En primer lugar, se formó HTQ durante dos minutos y medio. Subsiguientemente, se añadió ascorbato 150 µM (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) al HTQ y la mezcla se inyectó manualmente inmediatamente en la HPLC a tres minutos.

La Figura 4 muestra los resultados de la medición por HPLC de HT solo (control).

La Figura 5 muestra el efecto de la adición de tiroquinasa a HT, mostrando así la formación de su quinona (control).

La Figura 6 muestra el efecto de la adición de ascorbato a una mezcla de HT y tirocinasa.

Esto muestra que se forma de nuevo HT y que ya no hay HTQ presente después de tres minutos. La regeneración del HT mediante el ascorbato ha tenido lugar (ejemplo).

Ejemplo 4: Receta de galleta que comprende hidroxitirosol.

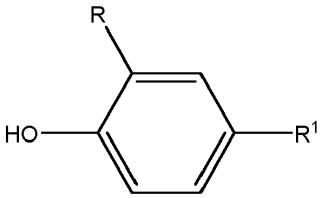
Ingredientes activos: hidroxitirosol 10-50 mg/por ración (típicamente 30 g)

Ingrediente	(g)
Harina de trigo	41,0
Azúcar	20,5
Grasa/Mantequilla	20,5
Huevo entero (líquido)	18,0
Aroma de limón	q.s.
Agente para hornear	q.s.

Todos los ingredientes se añaden lentamente con mezclado para formar una masa quebrada dulce. A continuación, la masa se mantiene fría (4 ºC) durante al menos 2 horas antes de aplanarla hasta un espesor de aproximadamente 5 mm. Se cortan piezas y se aplica yema de huevo en su superficie con una brocha antes de hornear. El horneado puede realizarse durante 15 minutos en un horno con ventilador a 180 ºC.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto comestible de fórmula (1)



(1)

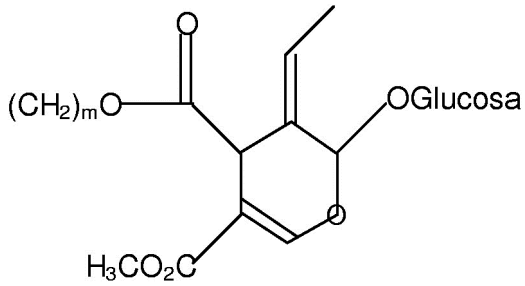
en la que:

R puede ser H, OH o CH_3O;

R^1 puede ser H o $(CH_2)_nOR^2$

en la que: n es 1, 2 o 3

R^2 es H, $COCH_3$ o



en la que m es 1, 2 o 3

con la condición de que R y R^1 no sean H al mismo tiempo,

para su uso en el tratamiento del daño muscular debido al ejercicio; con la condición de que la composición no sea una goma de mascar y que la composición no contenga salidrosida;

caracterizada por que el compuesto de fórmula (1) es hidroxitirosol o su acetato.

2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que además contiene vitamina C.

3. Composición según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la composición es un producto nutricional deportivo para su consumo por deportistas.

4. Composición según la reivindicación 3, caracterizada por que el producto nutricional deportivo es un suplemento dietético, bebidas deportivas o un alimento deportivo.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 anteriores, caracterizada por que el compuesto de fórmula (1) está presente en una cantidad de entre 1 mg y 3 g, preferentemente de 10 mg a 1 g, por ración.

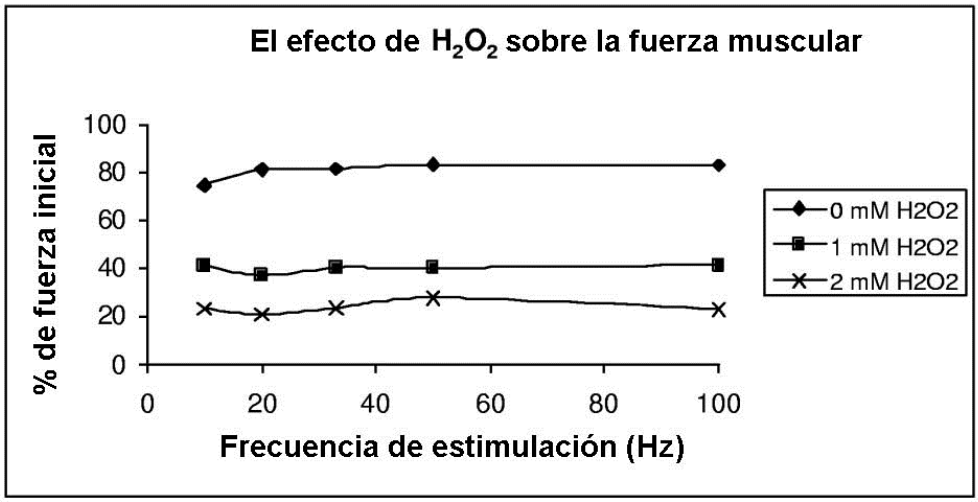


Figura 1. El efecto de H_2O_2 sobre la fuerza muscular

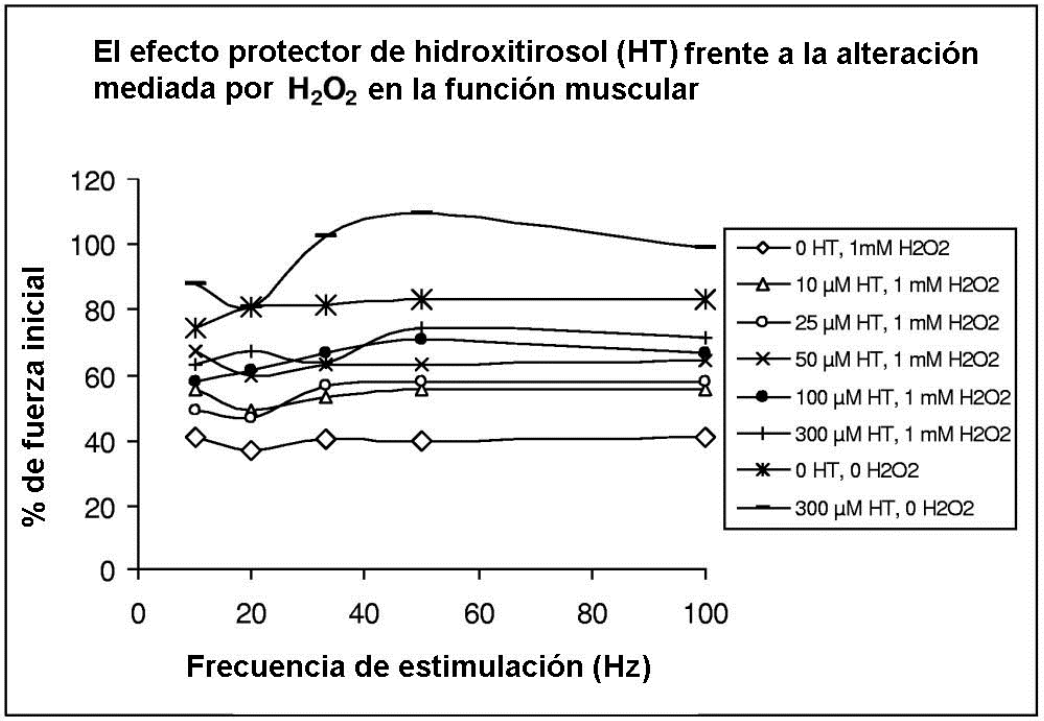


Figura 2. El efecto protector de HT frente al daño muscular mediado por H_2O_2

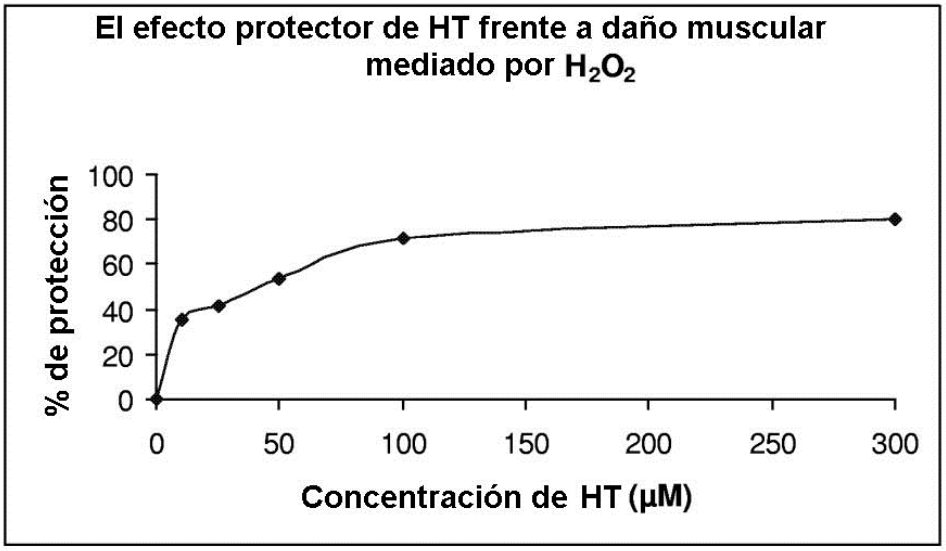


Figura 3. El efecto protector de HT frente al daño muscular mediado por H_2O_2

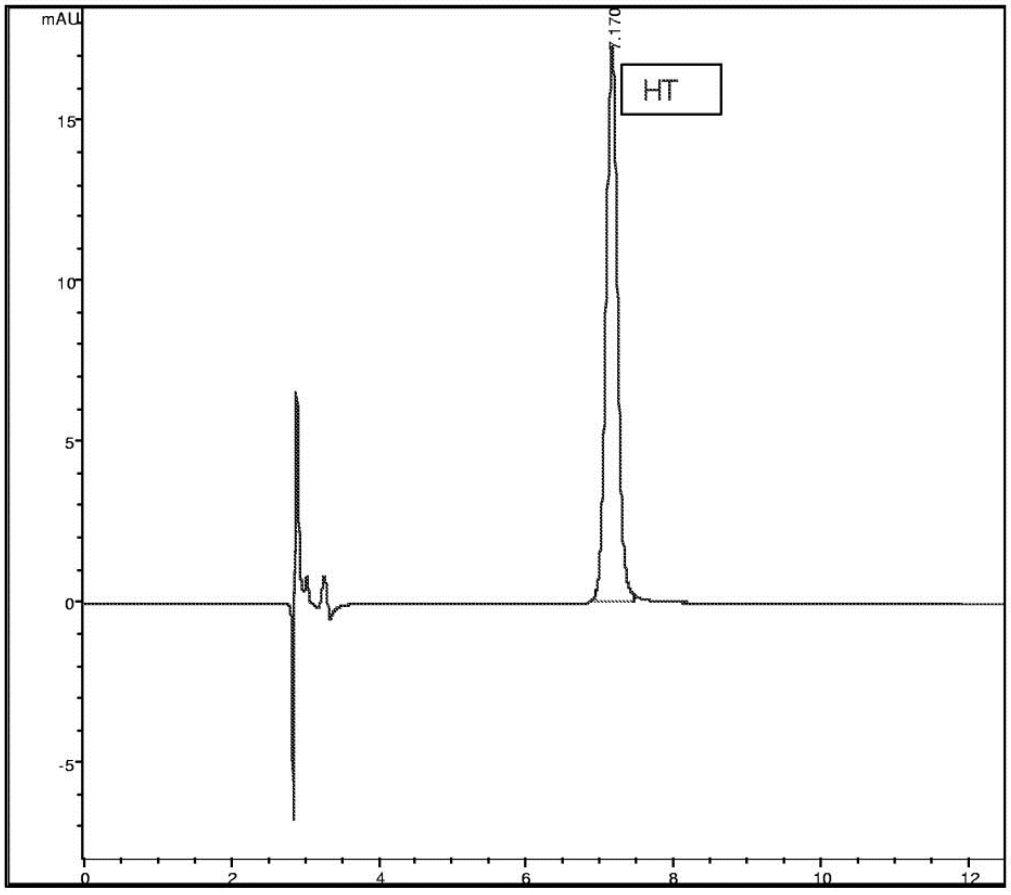


Figura 4. Gráfico HPLC de hidroxitirosol (HT)

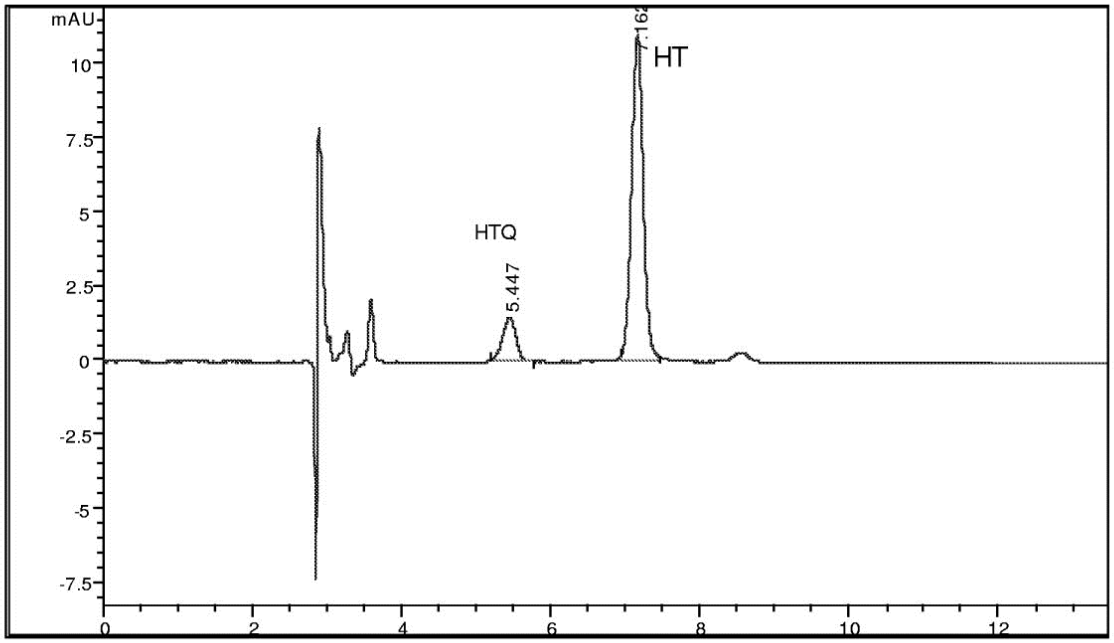


Figura 5. Gráfico HPLC de hidroxitirosol (HT) al que se añade tiroquinasa y la hidroxitirosol quinona (HTQ) formada.

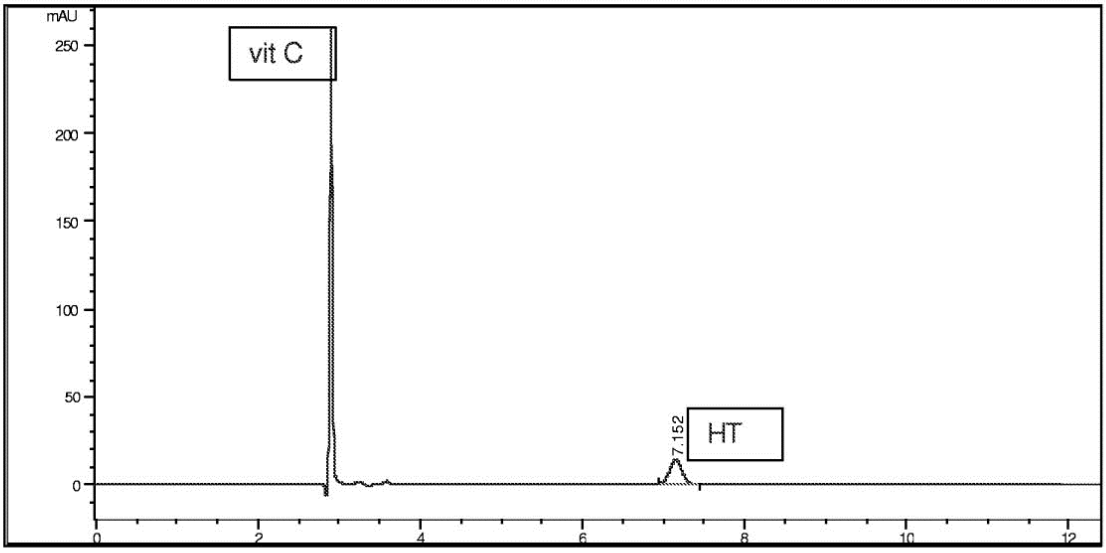


Figura 6. Gráfico HPLC de una mezcla de HT, tiroquinasa y ascorbato (vit. C).